

Université de Montréal

Étude d'un variant de la toxine STb produite par *Escherichia coli*

par

Christine Taillon

Département de pathologie et microbiologie
Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine vétérinaire
en vue de l'obtention du grade
maître ès sciences (M. Sc.)
en sciences vétérinaires
option microbiologie

Août 2009

© Christine Taillon, 2009

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé

Étude d'un variant de la toxine STb produite par *Escherichia coli*

présenté par

Christine Taillon

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Mariela A. Segura, présidente-rapporteuse

J. Daniel Dubreuil, directeur de recherche

Michaël Mourez, codirecteur

France Daigle, membre du jury

RÉSUMÉ

Les *E. coli* entérotoxinogènes (ETEC) sont souvent la cause de diarrhée post-sevrage chez le porc. Deux types d'entérotoxines sont retrouvées chez les ETEC, soit les thermolabiles, comme la toxine LT, et les thermostables, comme EAST-1, STa et STb. Cette dernière est composée de 48 acides aminés et est impliquée dans la pathologie causée par les ETEC. Pour la première fois un variant de la toxine STb fut découvert dans une étude. Nous avons alors émis l'hypothèse qu'il y a présence de variants dans la population de souches ETEC du Québec. Dans les 100 souches STb⁺ analysées, 23 possédaient le gène de la toxine avec une variation dans la séquence génétique : l'asparagine était présente en position 12 remplaçant ainsi l'histidine. Une corrélation entre la présence du variant et la présence de facteurs de virulence retrouvés dans ces 100 souches ETEC étudiées a été effectuée. Ce variant semble fortement associé à la toxine STa puisque toutes les souches variantes ont hybridé avec le gène codant pour cette dernière. Étant donné sa présence répandue dans la population de souches ETEC du Québec, nous avons de plus émis l'hypothèse que ce variant a des caractéristiques biologiques altérées par rapport à la toxine sauvage. L'analyse par dichroïsme circulaire a montré que le variant et la toxine sauvage ont une structure secondaire ainsi qu'une stabilité similaires. Par la suite, l'attachement au récepteur de la toxine, le sulfatide, a été étudié par résonance plasmonique de surface (biacore). Le variant a une affinité au sulfatide légèrement réduite comparativement à la toxine sauvage. Puisque l'internalisation de la toxine fut observée dans une étude précédente et qu'elle semble liée à la toxicité, nous avons comparé l'internalisation du variant et de la toxine sauvage à l'intérieur des cellules IPEC-J2. L'internalisation du variant dans les cellules est légèrement supérieure à l'internalisation de la toxine sauvage. Ces résultats suggèrent que le variant est biochimiquement et structurellement comparable à la toxine sauvage.

Mots clés: *E. coli* entérotoxinogène, diarrhée post-sevrage, facteurs de virulence entérotoxine STb, variant.

ABSTRACT

Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) are a major cause of post-weaning diarrhea. STb is one of two heat-stable toxins produced by ETEC and is mostly associated with pathogenic porcine isolates. For the first time, a variant of the toxin was observed in a study in 2003. Our hypothesis is that STb variants are present in ETEC strains from Quebec. To screen for alterations at the gene level, a collection of 100 STb⁺ ETEC strains isolated from diseased pigs was randomly selected and analyzed. A total of 23 strains had a change from His₁₂ to Asn. An association between the presence of the variant and virulence factors present in those strains was done. These strains were also positive for STa. Since this variant seems to be widely distributed in Quebec, we hypothesize that the variant has different biological properties compared to the wild-type STb. First, the secondary structure of the variant and wild-type toxin and their thermal stability was determined by circular dichroism. Both show similar structures and thermal stability. In addition, the binding affinity with the toxin receptor, the sulfatide, was determined by surface plasmon resonance. The affinity of the wild-type for the sulfatide is slightly superior to the variant. Finally, the internalization inside IPEC-J2 cells of the variant was compared to the wild-type. The variant is able to internalize more cells than the wild-type. Altogether, these results suggest that both the variant and the wild-type toxin are biochemically and structurally similar.

Keywords: Enterotoxigenic *Escherichia coli*, STb enterotoxin, post-weaning diarrhea, virulence factors, variant.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	iv
ABSTRACT	vi
TABLE DES MATIÈRES	viii
LISTE DES TABLEAUX	xii
LISTE DES FIGURES.....	xiii
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS.....	xiv
REMERCIEMENTS.....	xvi
 INTRODUCTION	 1
RECENSION DE LA LITTÉRATURE	4
1.0 <i>Escherichia coli</i>.....	5
1.1 Généralités	5
1.2 Classification des <i>E. coli</i> pathogènes.....	6
1.2.1 Les EPEC	7
1.2.2 Les EHEC.....	7
1.2.3 Les EAEC.....	8
1.2.4 Les EIEC	9
1.2.5 Les DAEC	9
1.2.6 Les ETEC	9
2.0 Les <i>Escherichia coli</i> entérotoxigène (ETEC)	10
2.1 Généralités	10
2.2 Mécanisme d'infection.....	10
2.3 Facteurs de virulence associés aux ETEC	11
2.3.1 Adhésines	12
2.3.2 Les entérotoxines.....	13
2.3.2.1 L'entérotoxine LT	14
2.3.2.2. Les entérotoxines thermostables (ST)	14
2.3.3 Facteurs de virulence pouvant être rencontrés chez les ETEC	16
2.3.4 Virotypes associés aux ETEC causant la diarrhée post-sevrage.....	17
3.0 L'entérotoxine STb.....	19
3.1 Généralités	19

3.2 Génétique	20
3.3 Biogenèse	21
3.4 Structure tridimensionnelle	23
3.5 Mécanisme d'action	25
3.5.1 Oligomérisation	25
3.5.2 Récepteur de la toxine	25
3.5.3 Altérations cellulaires	26
3.5.4 Internalisation	26
3.5.5 Activation d'une protéine G	27
3.5.6 Effet sur le système nerveux entérique	28
3.5.7 Perméabilisation membranaire	29
3.5.8 Hypothèse du mécanisme d'action	30
3.6 Études structure-fonction	31
3.7 Importance clinique	33
3.8 Découverte d'un variant	34
3.8.1 Description	35
3.8.2 Présence de variants chez d'autres toxines retrouvées dans les souches ETEC	36
3.8.2.1 EAST1	36
3.8.2.2 Stx2	37
3.8.3 Description du projet	37
MÉTHODOLOGIE ET RÉSULTATS	39
Article 1	40
Heterogeneity of <i>Escherichia coli</i> STb enterotoxin isolated from diseased pigs	41
Summary	42
Introduction	43
Materials and methods	45
Bacterial strains	45
Virotyping using colony hybridization	45
Isolation, amplification, and sequencing of DNA	46
Tetracycline susceptibility	46
Results	47
Discussion and conclusions	50
Acknowledgements	52

References	53
Tables	55
Article 2.....	57
Biochemical and biological characterisation of <i>Escherichia coli</i> STb His¹² to Asn variant	58
Abstract.....	59
Introduction.....	59
Materials and methods	62
2.1 Oligonucleotide-directed mutagenesis and DNA sequencing.	62
2.2 Production and purification of STb.	62
2.3 Circular dichroism analysis	63
2.4 Surface plasmon resonance analysis.....	64
2.5 Cell culture	65
2.6 Flow cytometry analysis.....	65
Results and discussion	67
Secondary structure of wildtype and variant STb.....	67
Receptor binding	68
Cellular internalization	68
Conclusion.....	70
References	71
Figures.....	74
DISCUSSION	77
Discussion.....	78
Présence d'un variant de la toxine STb dans les souches d' <i>Escherichia coli</i> d'origine porcine au Québec	78
Association du variant avec les facteurs de virulence et des virotypes ETEC.....	78
Effet de la mutation sur la toxine	80
Étude de la structure secondaire du variant.....	80
Étude d'internalisation	81
Étude de l'attachement au sulfatide	82
Conclusion	85
Perspectives	86
Présence du variant dans la population d'ETEC	86
Détermination de la présence du PAI I ₂₁₇₃ dans les souches où le variant est présent.....	86

Détermination de la toxicité du variant	86
Attachement du variant à d'autres gangliosides	87
Capacité du variant à former des oligomères	87
BIBLIOGRAPHIE	88

LISTE DES TABLEAUX

Recension de la littérature

Tableau 1 : Facteurs de virulence associés aux ETEC	17
Tableau 2: Virotypes associés aux ETEC	19

Méthologie et résultats

Table 1: Incidence of STb variant His ₁₂ to Asn in porcine <i>Escherichia coli</i> strains.	55
Table 2: Association of STb wildtype and STb variant strains with the virulence factors.	56

LISTE DES FIGURES

Recension de la littérature

Figure 1 : Image de microscopie électronique à balayage, représentant <i>Escherichia coli</i> adhérente sur une lamelle de verre.	5
Figure 2 : Mécanisme d'infection des ETEC chez le porc	11
Figure 3 : Cascade d'activation suite à l'attachement de STa à la guanylate cyclase-C.	15
Figure 4: Maturation de la toxine STb, du cytoplasme jusqu'à sa sécrétion.	22
Figure 5: Modèle schématique de la sécrétion de la toxine STb impliquant le transporteur de type ABC	23
Figure 6: Structure tridimensionnelle de la toxine STb.....	24
Figure 7: Illustration du mécanisme d'action suggérée pour la toxine STb.....	31
Figure 8: Structure secondaire de la toxine STb. Plusieurs mutants ponctuels de cette molécule ont été générés. Les acides aminés mutés sont indiqués en gras.	33
Figure 9: Organisation génétique du TSL du plasmide pTC.....	36

Méthologie et résultats

Figure 1: Structural characterization of purified STb toxins by CD	75
Figure 2: Label-free, real-time binding of STb toxins to SFT receptor by SPR	76
Figure 3: Internalization of STb toxins in IPEC-J2 cells	77

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

5-HT	5-hydroxytryptamine
AAF	Aggregative Adherence Fimbriae I and II
AIDA	Adhesin Involved in Diffuse Adherence
Asn	Asparagine
CaMKII	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate
CD	Circular dichroism
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator
cGMP	<i>Cyclic</i> adenosine monophosphate
CT	Cholera toxin
Cys	Cystein
DAEC	<i>E. coli</i> à adhérence diffuse: Diffusely adhering <i>E. coli</i>
DMEM	Dubelcco's modified eagle's medium
EAE	<i>E. coli</i> attaching and effacing factor
EAEC	<i>E. coli</i> entéroaggrégatif: Enteroaggregative <i>E. coli</i>
EAST-1	Heat-stable toxin <i>I</i>
EHEC	<i>E. coli</i> entérohémorragique : Enterohemorrhagic <i>E. coli</i>
EIEC	<i>E. coli</i> entéroinvasif: Enteroinvasive <i>E. coli</i>
EPEC	<i>E. coli</i> entéropathogène : Enteropathogenic <i>E. coli</i>
ETEC	<i>E. coli</i> entérotoxinogène : Enteropathogenic <i>E. coli</i>
ExPEC	<i>E. coli</i> extra-intestinale : Extracellular pathogenic <i>E. coli</i>
FITC	Fluorescein isothiocyanate
GC-C	Guanylate cyclase-C
Gln	Glutamine
His	Histidine
HPLC	High performance liquid chromatography
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside
Ile	Isoleucine

IS	Insertion Sequence
LEE	Locus d'effacement des entérocytes : Locus of effacement enterocytes
LT	Heat-labile toxine
MBP	Mannose binding protein
MNEC	Méningite néonatale à <i>E. coli</i> : Meningitis/sepsis-associated <i>E. coli</i>
Paa	Porcine attaching effacing associated protein
PAI	Pathogenicity island
PCR	Polymerase chain reaction
Pet	Plasmid-encoded toxin
PGE2	Prostaglandin E2
rpm	Révolution par minute
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
Sec	Secretory
SFT	Sulfatide
SHU	Syndrome hémolytique et urémique
SPR	Surface plasmon resonance
STa	Heat-stable toxine b
STb	Heat-stable toxine b
STEC	<i>E. coli</i> producteurs de Shiga-toxines : Shiga Toxine <i>E. Coli</i>
Stx	Shiga toxin
TSA	Tryptic soy agar
TSB	Tryptic soy broth
TSL	Toxin-Specific Locus
UPEC	Uropathogenic <i>E. coli</i>
VT	Verocytotoxin

REMERCIEMENTS

Tout au long de ma maîtrise, j'ai reçu l'appui de plusieurs personnes tant au niveau professionnel que personnel. Ces personnes sont...

Mon directeur, Dr. J. Daniel Dubreuil, pour m'avoir permis de réaliser cette recherche dans son laboratoire. Un grand merci pour son soutien et ses connaissances.

Mon co-directeur, Dr Michael Mourez, pour tout le bagage scientifique, sa passion pour la science, sa disponibilité malgré toutes ses responsabilités...un grand merci!

Les membres de mon comité conseil pour leurs idées; Dr. Mario Jacques et Dr. Derek Boerboom.

Marie-Astrid Albert, pour le soutien moral, pour tous les bons et mauvais moments...pour tout l'aide que tu m'as apporté pour certaines manip, surtout à la fin, tu as été géniale. It's now in the pot Marie!

Merci à Frédérick Berthiaume, Patrick Vincent, Francis Beaudry, Jacques Lussier, Éric Nadeau et Mark Hancock pour leur aide et conseil précieux.

Un gros merci aux membres du gremip, en particulier Élodie Destable pour son soutien incommensurable, ainsi que les membres du labo Mourez et Harel.

Enfin un gros merci à mon amoureux, mes parents, ma sœur et mon frère, aux autres membres de ma famille et à mes amis proches, qui ont cru en moi tout au long, quel support vous m'avez apporté.

INTRODUCTION

Parmi tous les différents pathotypes d'*Escherichia coli*, les *E. coli* entérotoxigènes (ETEC) sont la cause la plus commune des diarrhées humaines à travers le monde. Les ETEC causent, entre autres, la diarrhée du voyageur, mais aussi une diarrhée plus sévère chez les jeunes enfants, surtout dans les pays en voie de développement, entraînant parfois la mort. Les souches ETEC sont également une cause fréquente de diarrhées néonatales et post-sevrages chez des animaux d'élevage (veau, mouton, porcelet) causant de grandes répercussions sur l'industrie agricole.

Les ETEC provoquent la pathologie premièrement par la colonisation de l'intestin en adhérant à l'épithélium, puis par la production de toxines. Celles-ci perturbent l'homéostasie de l'intestin en augmentant la sécrétion et en diminuant l'absorption d'eau et d'électrolytes par les entérocytes, ce qui cause la diarrhée (Qadri *et al.*, 2005). Deux types d'entérotoxines sont sécrétées par les ETEC, soit les thermolabiles, comme la toxine LT, et les thermostables, comme EAST-1, STa et STb.

La toxine STb est principalement associée aux souches porcines, quoiqu'elle ait été retrouvée à quelques occasions associée à des isolats humains (Handl and Flock, 1992; Lortie *et al.*, 1991; Okamoto K, 1993). STb est une toxine de 5,2 kDa composée de deux hélices alpha antiparallèles séparées par une boucle riche en glycine. Deux ponts disulfures stabilisent la structure tertiaire (Sukumar *et al.*, 1995). La toxine se lie au sulfatide, un gliscosphingolipide présent sur les cellules de l'épithélium du jéjunum du porc. La toxine forme des oligomères, et cette étape semble survenir avant l'attachement au récepteur (Labrie *et al.*, 2001b). Suite à sa liaison avec le récepteur, la protéine G est activée par la toxine par un mécanisme encore inconnu. L'activation de la protéine G sensible à la toxine pertussique (G_{i3}), déclenche une cascade d'événements dont l'élévation de calcium intracellulaire et production de prostaglandine E_2 (PGE_2) et de 5-hydroxytryptamine (5-HT) menant à la diarrhée (Dreyfus *et al.*, 1993; Fujii *et al.*, 1995; Harville and Dreyfus, 1995; Peterson and Whipp, 1995).

Des études de mutagenèse ont permis de mettre en évidence les acides aminés importants pour diverses fonctions de la toxine. Les acides aminés présents dans la boucle riche en glycine sont importants pour la toxicité ainsi que pour l'attachement au sulfatide (Dreyfus *et al.*, 1992; Fujii *et al.*, 1994; Labrie *et al.*, 2001a). Des mutations dans l'hélice- α hydrophobe influencent aussi la toxicité et l'attachement au sulfatide. De plus, ces derniers n'ont plus la capacité de former des oligomères.

Une étude de Fekete *et al.* (2003) a révélé que le plasmide pTC, un plasmide conjugatif de 120 kb de la souche 2173 isolée d'un porc décédé de diarrhée post-sevrage, contenait un îlot de pathogénicité sur lequel se retrouvaient les gènes codant pour les entérotoxines STa et STb et un gène de résistance à la tétracycline (*tetB*). Par ailleurs, un variant génétique de la toxine STb a été mis en évidence, l'histidine en position 12 étant substituée par une asparagine, et la lysine en position 23 étant remplacée par une isoleucine (Fekete *et al.*, 2003). De plus, cette étude a révélé que cet îlot de pathogénicité était présent dans un grand nombre de souches et était particulièrement associé aux souches positives pour le fimbriae F18.

Aucun variant de la toxine n'avait été révélé avant cette étude au Québec. Suite à ceci, nous émettons l'hypothèse qu'un ou des variants de la toxine sont présents dans la population de souches ETEC porcins. De plus, ce(s) variant(s) pourrai(en)t avoir une toxicité altérée par rapport à la toxine sauvage. D'abord, nous avons déterminé la présence d'un variant dans la population de souches ETEC porcins du Québec. Nous avons établi une corrélation entre la présence de ce variant et des facteurs de virulence présents dans ces souches. Par la suite, nous avons comparé ce variant avec la toxine sauvage à différents niveaux; structure secondaire et la stabilité de cette dernière, l'attachement au sulfatide, et puis finalement l'internalisation dans des dérivées de cellules de jejunum porcin, IPEC-J2.

RECENSION DE LA LITTÉRATURE

1.0 *Escherichia coli*

1.1 Généralités

C'est dans la flore commensale de nourrissons qu'*Escherichia coli* (Figure 1) a été observé pour la première fois au 19^e siècle par le Dr. Escherich. Il a décrit le coliforme comme étant un habitant de la flore microbienne d'individus en bonne santé. Depuis, *E. coli* est devenu un outil indispensable à la recherche, surtout en biologie moléculaire, notamment grâce à sa culture aisée. Cette bactérie a servi de modèle pour l'élucidation des principes fondamentaux de la régulation génétique, sans compter son utilité comme hôte pour le clonage de gènes et la production de protéines recombinantes (Donnenberg and Whittam, 2001; Kaper *et al.*, 2004).



Figure 1 : Image de microscopie électronique à balayage, représentant *Escherichia coli* adhérente sur une lamelle de verre. Tiré de Rocky Mountain Laboratories, NIAID, NIH, Bethesda, MD, USA

E. coli est une bactérie à gram négatif à flagelles péritriches de la famille des *Enterobacteriaceae* qui, typiquement, colonise le tractus gastro-intestinal. Plus

spécifiquement, la niche d'*E. coli* est localisée dans la couche de mucus du colon chez les mammifères. *E. coli* entre dès lors en compétition avec d'autres membres de la flore intestinale, prévenant ainsi l'adhérence et la colonisation de bactéries pathogènes, et ainsi devenir une des bactéries commensales anaérobies facultatives de la flore intestinale. Les mécanismes par lesquels *E. coli* parvient à coloniser aussi efficacement l'intestin ne sont toujours pas bien caractérisés (Kaper *et al.*, 2004). Pendant près d'un demi-siècle, *E. coli* a été exclusivement considérée comme un microorganisme commensal. Cependant, il s'est avéré qu'*E. coli* était capable d'être un pathogène humain et animal. En effet, certaines souches se sont adaptées et ont acquis des facteurs de virulence spécifiques qui leur permettent de coloniser de nouvelles niches et de survivre, tout en causant diverses pathologies tels des gastro-entérites, infections urinaires, méningites, ou septicémies. De plus, *E. coli* est un pathogène important dans l'industrie agricole, surtout chez les jeunes animaux.

1.2 Classification des *E. coli* pathogènes

Les facteurs de virulence sont fréquemment codés sur des éléments génétiques mobiles, engendrant ainsi différentes combinaisons de ces facteurs. Certains de ces éléments génétiques ont évolué et se sont intégrés au génome. Les *E. coli* pathogènes provoquent quatre syndromes cliniques généraux, soit des maladies entériques, des infections urinaires, la septicémie et la méningite. On retrouve six classes majeures d'*E. coli* (pathotypes) causant des infections intestinales : les *E. coli* entéropathogènes (EPEC), entérohémorragiques (EHEC), entéroagréatives (EAEC), entéroinvasives (EIEC), les *E. coli* à adhérence diffuse (DAEC) et finalement les entérotoxigènes (ETEC). Il existe aussi d'autres classes d'*E. coli*, celles-ci étant responsables des infections extra-intestinales (ExPEC), soit les *E. coli* responsables des septicémies et des méningites (MNEC) et les uropathogènes (UPEC) (Kaper *et al.*, 2004). Cette classification distingue les groupes composés de différentes souches d'*E. coli* ayant un mode de pathogenèse similaire et causant des symptômes semblables. De plus, les différentes souches d'*E. coli* sont caractérisées par la présence d'antigènes lipopolysaccharidiques (O), flagellaires (H) et capsulaires (K), résultant en un

sérotype particulier. La pathogenèse des souches virulentes se traduit généralement par l'adhérence au site mucosal puis la colonisation de ce dernier, par l'évasion du système immunitaire de l'hôte, la multiplication et enfin, par un effet néfaste sur l'hôte. Ce comportement est commun à la plupart des pathogènes mucosaux.

1.2.1 Les EPEC

Le pathotype EPEC a été le premier décrit suite à des épidémies de diarrhée infantile au Royaume-Uni et dans d'autres pays industrialisés dans les années 1940-1950 (Chen and Frankel, 2005; Kaper *et al.*, 2004). Encore aujourd'hui, les EPEC continuent d'être une cause majeure de diarrhée infantile, principalement dans les pays en voie de développement. Des études rapportent un taux de mortalité s'élevant à 30 % chez les patients affectés (Senerwa *et al.*, 1989). Les EPEC causent des lésions attachantes et effaçantes intestinales, caractéristique histopathologique associée à ce pathotype. Ces lésions sont caractérisées par la destruction des microvillosités de la bordure en brosse de l'épithélium du jéjunum, puis par le réarrangement du cytosquelette des cellules épithéliales, formant ainsi un piédestal (Donnenberg and Whittam, 2001; Kaper *et al.*, 2004). Les gènes responsables de ces lésions sont localisés sur un îlot de pathogénicité de 35 kb appelé le locus d'effacement des entérocytes (LEE). Les signes cliniques associés à une infection causée par des EPEC sont des diarrhées sévères, de la fièvre et des vomissements.

1.2.2 Les EHEC

Le pathotype EHEC regroupe des souches d'*E. coli* capables de provoquer des diarrhées sanglantes et le syndrome urémique hémolytique (SHU). Des épidémies de colites hémorragiques ont permis d'identifier ce pathotype dans les années 1980. Une souche O157: H7 fut à l'origine de ces épidémies. Cette dernière est responsable des épidémies d'EHEC les plus nombreuses impliquant le plus grand nombre d'individus (Donnenberg and Whittam, 2001). Les pathogènes appartenant à ce sérotype ont une

dose infectieuse de moins de 100 bactéries, et sont retrouvés souvent dans les aliments tels les saucisses, le lait non-pasteurisé, la laitue, le melon, et le jus de pomme (Kaper *et al.*, 2004). La production de vérocytotoxine (VT), aussi appelée Shiga toxine (Stx) est caractéristique aux EHEC. La Shiga toxine est produite dans le colon, où elle va pénétrer les cellules et va entrer dans la circulation sanguine jusqu'aux reins où elle va endommager les cellules endothéliales, causant une inflammation rénale et éventuellement entraîner le SHU. La toxine Stx est aussi responsable de l'apoptose des cellules épithéliales du colon, résultant en une diarrhée sanglante. Certaines souches d'EHEC possèdent, tout comme les EPEC, le LEE (locus d'effacement des entérocytes). Ces souches sont donc capables de causer des lésions attachantes et effaçantes (Luck *et al.*, 2005).

1.2.3 Les EAEC

Les EAEC sont caractérisées par leur adhérence agrégative, forment une structure ressemblant à des 'briques empilées' (Kaper *et al.*, 2004; Weintraub, 2007). Les EAEC, une fois adhérentes, envahissent le colon et s'y multiplient pour finalement sécréter des entérotoxines et cytotoxines ainsi que d'autres facteurs de virulence. Ces derniers vont favoriser la sécrétion de mucus et par la suite, la formation d'un biofilm bactérie-mucus (Weintraub, 2007). Les souches dites 'prototypes' possèdent également l'adhésine AAF (Aggregative Adherence Fimbriae I et II) (Zamboni *et al.*, 2004). Deux toxines sont souvent associées aux infections causées par les EAEC, soit les toxines Pet (Plasmid-encoded toxin) et l'entérotoxine entéroagrégate stable à la chaleur (EAST-1). Cependant, plusieurs autres facteurs de virulence semblent également impliqués dans la pathogenèse des EAEC (Menard and Dubreuil, 2002; Weintraub, 2007).

1.2.4 Les EIEC

Ce pathotype d'*E. coli* provoque une pathologie quasi identique à *Shigella* spp., ces deux espèces bactériennes étant responsables de la shigellose chez l'humain. Dans la plupart des cas, les EIEC vont causer des diarrhées aqueuses, mais occasionnellement, elles peuvent engendrer des syndromes dysentériques et la colite inflammatoire invasive suite à l'invasion de la bactérie dans la muqueuse. Elles pénètrent via les cellules M, et se répandent jusqu'à la lamina propria. Les gènes requis pour l'invasion sont présents sur un plasmide de 213 kb, codant, entre autre, pour un système de sécrétion de type III (Parsot, 2005).

1.2.5 Les DAEC

Les DAEC sont caractérisées par leur capacité d'adhérence diffuse aux lignées cellulaires immortelles HEp-2 et HeLa, ainsi qu'à une variété de lignées cellulaires de mammifères. Elles causent notamment des diarrhées infantiles, mais ont été également associées à diverses infections entériques et urinaires (Servin, 2005). Plusieurs souches de ce pathotype possèdent le fimbriae F1845, ainsi que l' 'Adhesin Involved in Diffuse Adherence' (AIDA-I), leur permettant d'adhérer (Kaper *et al.*, 2004; Laarmann and Schmidt, 2003; Servin, 2005).

1.2.6 Les ETEC

Le pathotype ETEC est majoritairement impliqué dans la diarrhée du voyageur, ainsi que la diarrhée infantile dans les pays en voie de développement où les conditions d'hygiène sont inadéquates. L'eau et la nourriture contaminée sont les principales sources d'infections de ce pathotype. Bien que les jeunes enfants soient les principales cibles des ETEC, les adultes n'ayant jamais été en contact avec des

souches ETEC sont aussi sensibles aux infections (Nataro and Kaper, 1998). Ces pathogènes sont annuellement responsables de 210 millions de cas d'infection, et environ 380 000 de ces cas sont mortels (WHO, 2008). Mais l'humain n'est pas la seule cible des ETEC. En effet, l'industrie agroalimentaire subit de nombreuses pertes économiques dues aux infections causées par ce pathotype. Une discussion plus approfondie sur les ETEC sera apportée dans la section suivante.

2.0 Les *Escherichia coli* entérotoxigène (ETEC)

2.1 Généralités

Comme mentionné ci-haut, les souches ETEC sont aussi responsables de cas de diarrhées sévères chez les animaux. Elles affectent principalement les veaux et les porcs. D'ailleurs, les ETEC sont la principale cause de diarrhée post-sevrage chez les porcs, responsables d'environ 2 à 5 % de mortalité, et nécessitant des traitements aux antibiotiques dans 20 à 50 % des porcs après sevrage (Nagy and Fekete, 2005).

2.2 Mécanisme d'infection

La première étape dans une infection aux ETEC est caractérisée par l'adhérence à l'épithélium du petit intestin, sans modification morphologique de ce dernier. La sécrétion de protéines spécifiques est ensuite une étape clé, stimulant la perte d'eau et d'électrolytes par les entérocytes et diminuant l'absorption, causant ainsi la diarrhée (figure 2). Ainsi les principaux facteurs de virulence des ETEC sont les adhésines et les entérotoxines.

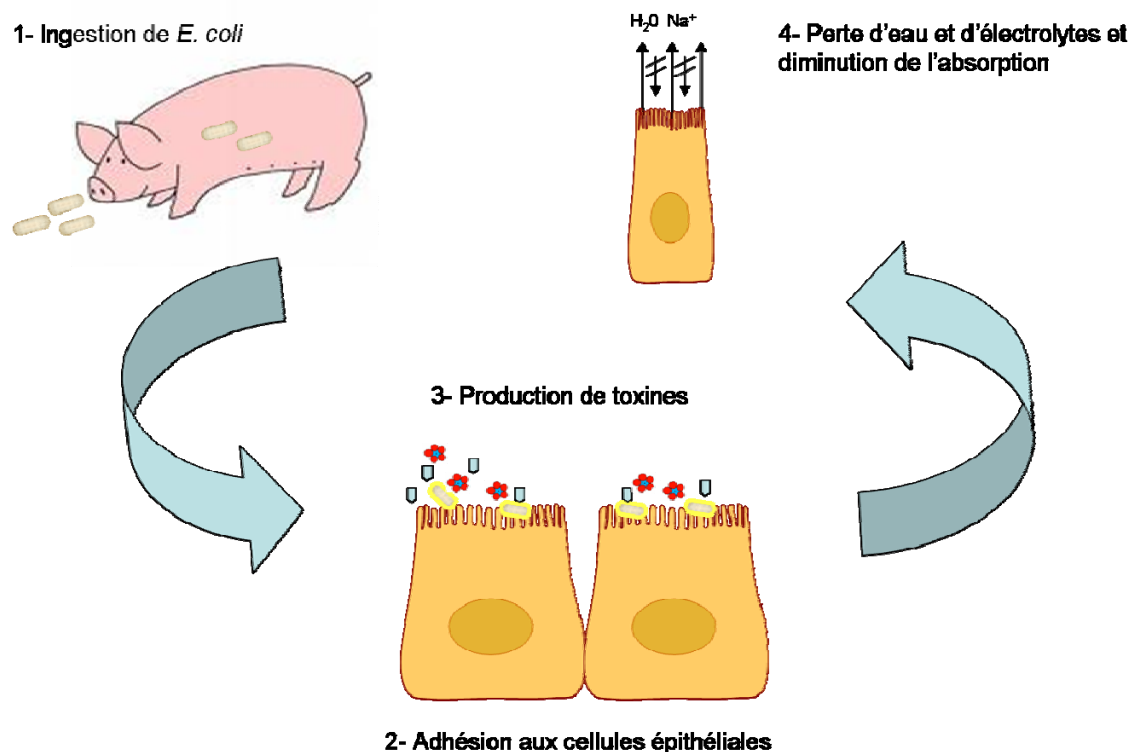


Figure 2 : Mécanisme d'infection des ETEC chez le porc (adapté de Fairbrother *et al.*, 2005)

2.3 Facteurs de virulence associés aux ETEC

La plupart des gènes de virulence associés aux ETEC sont codés sur de larges plasmides sur lesquels on retrouve fréquemment des gènes de résistance aux antibiotiques (Fairbrother 2005, Kaper 1999). La liaison entre plusieurs gènes de virulence a d'ailleurs été observée chez les ETEC (Gyles 1985). Un fragment de 10-kb, isolé d'un plasmide de virulence qui contenait notamment le gène conférant la résistance à la tétracycline, appelé Toxin-Specific Locus (TSL), contenait aussi les gènes codant pour les entérotoxines STa et STb (Fekete *et al.*, 2003). De plus, des éléments de séquence d'insertion IS, soit *IS1* et *IS91* ont été identifiés dans un fragment de 40 kb contenant le TSL. Ce TSL contenait un fragment du gène tARN

pheV, indiquant un site d'insertion, et des fragments avec des séquences similaires à d'autres plasmides de virulence présents chez différents pathogènes entériques, tel EHEC O157. La présence de *pheV*, aussi décrit comme étant associé avec les gènes de capsules sur un îlot de pathogénicité des UPEC, appuie l'hypothèse que ce TSL fait parti d'un îlot de pathogénicité (PAI I2173).

2.3.1 Adhésines

Les adhésines interviennent dans la première étape de l'infection par les ETEC, via l'attachement aux microvillosités du petit intestin. Les principales adhésines des ETEC sont fimbriaires. Les fimbriae animaux F4, F5, F6, F17, F18 et F41, sont présents dans les souches ETEC porcines et bovines. De plus, F42 et F165 ont été décrits chez les ETEC, mais leur implication dans la pathologie n'a pas encore été déterminée. Ces fimbriae vont s'attacher à leur récepteur respectif, soit un glycolipide ou une glycoprotéine, présent dans la bordure en brosse de l'épithélium du jéjunum du porc. Par conséquent, l'absence de ce récepteur rend l'animal résistant à la colonisation par les ETEC. Les fimbriae de type F4 et F18 sont les plus fréquemment retrouvés chez les ETEC isolés de porcs atteints de diarrhée.

Les fimbriae F18 sont de longs appendices flexibles. On distingue deux groupes antigéniques parmi ces derniers, soit F18ab et F18ac. Ce fimbria est souvent présent dans des souches exprimant aussi les entérotoxines STa et STb, avec ou sans la shiga toxine 2 (Stx₂), mais rarement associé à la présence de la toxine LT. Il est principalement associé avec la maladie de l'œdème et la diarrhée post-sevrage. Le fimbria F18 est exprimé à 37°C et adhère à l'épithélium du jéjunum du porc âgé de trois semaines et plus, ses récepteurs n'étant pas présents chez les porcs plus jeunes.

Les fimbriae F4 sont constitués de trois groupes antigéniques, soit F4ab, F4ac et F4ad. Ces différences antigéniques sont attribuables à quelques changements au niveau des acides aminés (Grange *et al.*, 2002). Ceux-ci adhèrent aux hydrates de carbone et aux glycoconjugués présents sur les cellules épithéliales de l'intestin, sur le

mucus intestinal et sur les globules rouges (Erickson *et al.*, 1994; Grange *et al.*, 2002). Les récepteurs du fimbriae F4 sont présents dès la naissance du porc. Les ETEC exprimant ce fimbria sont une cause majeure de diarrhée et de mortalité néonatale et post-sevrage chez l'animal (Jin *et al.*, 2000; Moon *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2007). La résistance au fimbria F4 est un trait mendélien autosomal récessif (Wang *et al.*, 2007). Les trois groupes antigéniques ont aussi un attachement spécifique, de telle sorte que certains porcs sont susceptibles aux trois types de fimbriae F4, d'autres à deux, d'autre seulement à un type, et finalement certains sont tout simplement résistants aux trois types (Francis *et al.*, 1999).

En plus des fimbriae, d'autres facteurs d'adhésion contribuent à la virulence des ETECs. AIDA-I, une adhésine afimbriale, appartient à la famille des autotransporteurs monomériques du système de sécrétion de type cinq (Henderson *et al.*, 2004). Cet autotransporteur est responsable de l'adhérence à différentes surfaces ainsi qu'à l'adhérence bactérie à bactérie, contribuant de cette façon à la formation de biofilm. D'ailleurs, l'adhésine AIDA-I est associée aux diarrhées post-sevrage chez le porc et joue un rôle dans la colonisation de l'intestin de ces derniers (Ha *et al.*, 2003; Ngeleka *et al.*, 2003). Une étude de Niewerth en 2001 montre que le gène codant pour AIDA-I est prévalent dans la population porcine, son gène a été identifié dans 40,9% de souches d'*E. coli* porcins souffrant de la maladie de l'œdème et de diarrhée post-sevrage (Niewerth *et al.*, 2001).

2.3.2 Les entérotoxines

Les entérotoxines sécrétées par les ETEC sont portées sur des plasmides, et sont classées en deux catégories, soit les toxines thermolabiles (LT) ayant un poids moléculaire élevé, soit les toxines thermostables (ST) ayant un poids moléculaire plutôt faible.

2.3.2.1 L'entérotoxine LT

LT est produite principalement par les souches humaines et porcines ETEC (Nagy and Fekete, 2005), et est apparentée à la toxine du choléra (CT) avec 77% d'homologie au niveau nucléotidique (Fairbrother *et al.*, 2005). Les mécanismes d'action de la toxine LT sont bien connus et similaires à ceux de la toxine CT. Ces toxines sont composées d'un domaine A et de cinq sous-unités B, ces dernières responsables de l'attachement au récepteur ganglioside GM1 (Spangler, 1992). Le domaine A est responsable de la ribosylation de la sous-unité α de la protéine G, menant à la constante activation de l'adénylate cyclase et ainsi à la production d'AMP cyclique (cAMP). Cette augmentation de cAMP intracellulaire va éventuellement mener à sécrétion d'ions Cl^- et d'eau dans la lumière intestinale. La particularité de la toxine LT, contrairement à la toxine CT, est qu'elle s'accumule dans l'espace périplasmique. En effet, elle est moins exportée à la surface de la bactérie que la toxine CT.

2.3.2.2. Les entérotoxines thermostables (ST)

Les entérotoxines thermostables sont séparées en deux classes, soit STa et STb (une description de cette toxine est faite en détail dans la section 3.0). STa est un peptide de deux kDa présent chez le porc et chez le veau, soluble dans le méthanol et dans l'eau. Contrairement à STb qui peu induire la sécrétion de fluide chez les porcs nouveau-nés et sevrés, STa agit seulement chez le porc nouveau-né (Fairbrother *et al.*, 2005; Nagy and Fekete, 1999). STa est un analogue structural de l'hormone guanyline et s'attache à la guanylate cyclase-C (GC-C). Ceci a pour effet l'activation de la guanylate cyclase, et par le fait même, le niveau de la monophosphate guanosine cyclase (cGMP) augmente à l'intérieur des entérocytes (Golin-Bisello *et al.*, 2005). L'accumulation intracellulaire de cGMP va activer le CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator) et ainsi le canal sécrètera des ions Cl^- (Golin-Bisello *et al.*, 2005). L'absorption de l'eau et des électrolytes sera également réduite

et la sécrétion de ceux-ci sera augmentée (Nagy and Fekete, 2005) (Fairbrother *et al.*, 2005) (Figure 3).

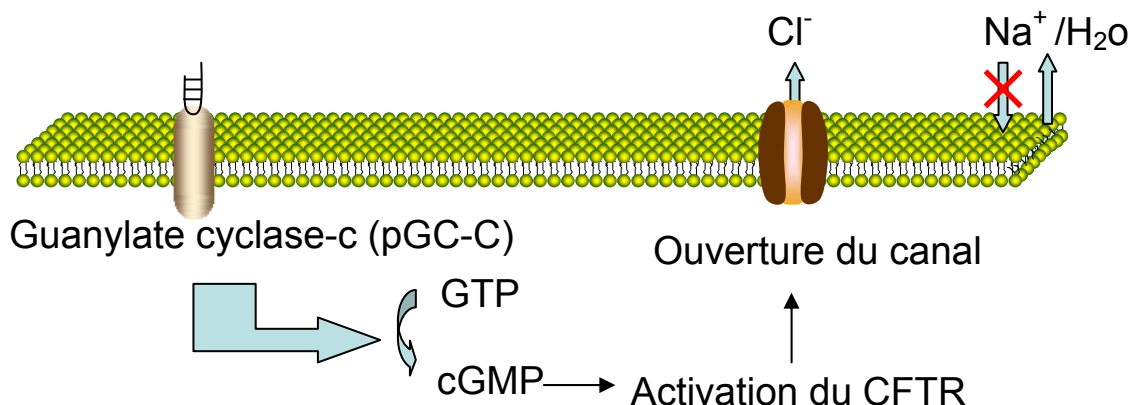


Figure 3 : Cascade d'activation suite à l'attachement de STa à la guanylate cyclase-C.

Le gène *estA* codant pour la toxine STa est intégré au transposon *Tn1681* que l'on retrouve sur des plasmides de diverses tailles (So and McCarthy, 1980). Les entérotoxines STa sont subdivisées en deux génotypes, soit STaH et STaP, composés de 18 et 19 acides aminés respectivement (Moseley *et al.*, 1983; Ruth *et al.*, 2005); STaP étant uniquement présent chez le porc. STa forme trois ponts disulfures qui sont essentiels pour l'activité de la toxine (Batisson and der Vartanian, 2000).

Une autre entérotoxine démontrant une forte homologie avec l'entérotoxine STa et la guanyline est EAST1. La toxine EAST1 a d'abord été découverte chez la souche humaine EAEC 17-2 isolée d'un enfant souffrant de diarrhée (Savarino *et al.*, 1991). Le gène codant pour l'entérotoxine EAST1 est très répandu dans les souches ETEC porcines, surtout chez les ETEC F4-positives, mais son expression dans ces souches demeure incertaine. Cette toxine est aussi largement répandue chez les autres classes d'*E. coli* pathogènes (Lopes *et al.*, 2005; Paiva de Sousa and Dubreuil, 2001; Stephan and Untermann, 1999), mais est surtout associée aux souches EAEC (Nishikawa *et al.*, 2002). Une étude de 2003 a révélé la présence du gène codant pour la toxine, *astA*, dans 31,3 % de souches isolées de porcs diarrhéiques ou atteints de la maladie de l'œdème (Choi *et al.*, 2001). De ces souches, 44,3% ne possédaient aucun fimbria ou gène codant pour une toxine connue. Des souches EAEC n'ayant aucun

autre facteur de virulence connu, excepté EAST1, ont été associées à des épidémies et à des cas isolés de diarrhée (Itoh *et al.*, 1997; Kawano *et al.*, 1998). Par contre, *astA* est également retrouvé dans les souches commensales isolées de porcs sains (Chapman *et al.*, 2006).

2.3.3 Facteurs de virulence pouvant être rencontrés chez les ETEC

Le tableau 1 résume les facteurs de virulence rencontrés chez les souches ETEC. Paa (porcine attaching effacing associated protein) est retrouvé dans plusieurs pathotypes de *E. coli*, et son rôle dans le développement des lésions attachantes et effaçantes a été démontré (Batisson *et al.*, 2003). Cette étude suggère que ce facteur de virulence aurait un rôle d'adhésine. Par contre, son rôle exact chez les souches ETEC n'est pas connu.

Tableau 1 : Facteurs de virulence associés aux ETEC

Adhésines	Récepteur
F4 (K88)	Sialo-glycoprotéine
F5 (K99)	Glycolipide (NeuGC-GM3)
F6 (987P)	Glycoprotéine/sulfatide
F17 (Fy)	Glycoprotéine
F18	Glycoprotéine
F41	Glycoprotéine
F42	Glycoprotéine
F165	Glycoprotéine
AIDA	Glycoprotéine inconnue
Paa	Inconnu

Toxines	Action	Récepteur
LT	↑ [cAMP] par stimulation de l'adénylate cyclase	Ganglioside GM1/ autres gangliosides
STa	↑ [cGMP] par stimulation de la guanylate cyclase	Guanylyl cyclase C
STb	Activation d'une protéine G/ ↑ Ca^{2+} intracellulaire	Sulfatide
EAST1	↑ [cGMP] par stimulation de la guanylate cyclase	Guanylyl cyclase C

2.3.4 Virotypes associés aux ETEC causant la diarrhée post-sevrage

La plupart des souches ETEC isolées de porcs diarrhéiques possèdent soit le fimbriae F4 ou F18 (Frydendahl 2002, Fairbrother 2005). Cependant, un certain nombre de souches ne possèdent pas ces fimbriae. D'autres études restent à effectuer afin de déterminer si ces souches possèdent d'autres adhésines leur permettant de coloniser l'hôte ou de mettre en évidence d'autres facteurs de virulence causant la pathologie. Cependant, un certain nombre de ces souches peuvent également posséder l'adhésine AIDA, ainsi que la toxine LT, et ces deux facteurs de virulence ont

démontré un rôle dans l'adhérence (Ha *et al.*, 2003; Johnson *et al.*, 2009; Ngeleka *et al.*, 2003).

Plusieurs virotypes sont retrouvés dans les souches ETEC, et ces virotypes diffèrent d'année en année. Des études rétrospectives ont révélé la présence du virotype LT:STb:EAST1 avant 1990 et depuis, le gène *estA* y est présent. Ce nouveau virotype reste encore très prévalent, même si on ne le retrouve pas ou très peu dans d'autres pays et/ou régions (Francis, 2002; Osek, 2003).

Au Québec, une étude de 1992-1993 a révélé que le fimbria F18 était prédominant (Fairbrother, 1994). Des années 1994 à 1998 par contre, c'est le fimbria F4 qui est devenu prédominant, étant présent dans presque la moitié des souches ETEC (Fairbrother, 2000; Fontaine F, 2002). Ces souches F4-positives étaient de sérotype O149, et le virotype prédominant était LT:STb:EAST1:F4. Dans d'autres études qui ont suivi, un autre virotype, LT:STa:STb:EAST1:F4, a fait surface et était aussi dominant que le précédant. Les autres virotypes retrouvés à travers ces études étaient F18:STa:STb, ainsi que STa:STb et STb:EAST1:AIDA. Le tableau 2 révèle les virotypes majeurs retrouvés au cours des années dans plusieurs pays.

Tableau 2: Virotypes associés aux ETEC

Virotype	Années	Pays
LT:STb:EAST1:F4	< 1990, 1994 1999-2000	Canada Pologne
LT:STa:STb:EAST1:F4	1994-2001 1999-2000	Canada Pologne
LT:STb:EAST1:F18	1999-2000	Pologne
STa:STb:F18	1994-1998 1999-2000 2001-2002	Canada Pologne États-Unis
LT:STb:EAST1:Stx2e:F18	1999-2000 ???	Pologne Suisse
Stx2e:F18	1999-2000	Pologne
LT:STb:F4	2001-2002 1986-1991 ???	États-Unis Espagne Suisse
STa:STb:Stx2e:F18	2001-2002 ???	États-Unis Suisse
STb:EAST1:AIDA:F18	1994-1998	Canada

En résumé, l'étude de l'ensemble de ces virotypes tend à démontrer que les gènes codant pour la toxine LT, STb EAST1 et F4 sont fortement associés, ainsi que STb, STa et F18.

3.0 L'entérotoxine STb

3.1 Généralités

L'autre entérotoxine stable à la chaleur, STb, n'a aucune homologie au niveau génétique avec STa. Isolée pour la première fois en 1978 d'une souche d'*E. coli* porcine (Burgess *et al.*, 1978), elle est présente sous forme active chez le porc, mais on la retrouve aussi chez des souches isolées d'autres espèces telles le bovin, le poulet, le chien, le chat, le cheval, et on la retrouve également chez l'homme (Akashi

et al., 1993; Beutin, 1999; Echeverria *et al.*, 1985; Hammermueller *et al.*, 1995). Son effet chez l'homme est cependant controversé. Effectivement, une étude *in vitro* a examiné l'effet de la toxine sur l'iléon humain dans une chambre de Ussing. Cette technique n'a pas su démontrer un effet de la toxine sur l'iléon humain, mais par contre on voyait un effet lorsque le jéjunum porcin était utilisé (Weikel *et al.*, 1986).

La toxine est très peu immunogénique. Plusieurs injections chez l'animal de laboratoire sont nécessaires afin d'obtenir des anticorps anti-STb. On obtient plus facilement des anticorps lorsque l'on couple la toxine à une protéine de fusion (Dubreuil *et al.*, 1996). Ces anticorps peuvent neutraliser la toxine, mais sont incapables de neutraliser les toxines STa et CT (Hitotsubashi *et al.*, 1992).

La toxine est capable de résister à des milieux basiques et alcalins allant du pH 2 au pH 12 ainsi qu'à un traitement à l'urée (8 M). Par contre, STb reste sensible à la dégradation protéolytique, en particulier par les enzymes du type trypsine, ce qui la rend très difficile à manipuler (Whipp, 1991).

3.2 Génétique

Le gène *estB* codant pour STb est retrouvé sur des plasmides hétérogènes, tout comme plusieurs autres facteurs de virulence associés aux ETEC. Un transposon de 9 kb dénommé *Tn4521* porte le gène *estB*. Ce dernier a la capacité de se transposer d'un plasmide à un autre, répandant ainsi ce gène de virulence dans les souches ETEC (Hu and Lee, 1988; Hu *et al.*, 1987; Lee *et al.*, 1985). D'ailleurs, le gène de la toxine est largement présent dans la population de souches ETEC. Une étude récente a détecté le gène dans 72,6% des souches possédant des gènes codant pour des fimbriae et provenant de porcs diarrhéiques aux États-Unis (Zhang *et al.*, 2007).

L'expression du gène de la toxine est très faible, et cela semble être dû à une faible initiation de transcription car la région -10 du promoteur de STb est différente de la séquence consensus au niveau de la base T finale (Spandau and Lee, 1987). De

plus, la présence de glucose dans le milieu peut réprimer l'expression du gène *estB*. Cette répression est réversible avec l'ajout de l'AMPc (Busque *et al.*, 1995).

3.3 Biogenèse

STb est synthétisée dans le cytoplasme en tant que polypeptide immature de 71 acides aminés (Lee *et al.*, 1983). Sa séquence signal de 23 acides aminés est clivée lors de sa maturation dans le périplasme via le système de sécrétion de type II (SecA), résultant alors en un peptide de 48 acides aminés ayant un poids moléculaire de 5200 Da. Deux ponts disulfures sont ainsi formés dans le périplasme par la protéine périplasmique DsbA avant sa sécrétion à l'extérieur de la bactérie (Dreyfus *et al.*, 1992; Foreman *et al.*, 1995) (Figure 4).

La formation de ces ponts disulfures est essentielle pour la sécrétion de la toxine (Arriaga *et al.*, 1995; Dreyfus *et al.*, 1992). En effet, on a observé que des mutants de la toxine, où les ponts disulfures ne sont pas formés, ont été exportés et dégradée dans le périplasme (Dreyfus *et al.*, 1992). Ces observations ont suggéré que l'absence des ponts disulfures rend la toxine sensible aux protéases périplasmiques (Arriaga *et al.*, 1995; Dreyfus *et al.*, 1992; Okamoto *et al.*, 1995). De plus, un mutant *dsbA*, formant les ponts disulfures à un rythme beaucoup plus lent, est incapable de produire la toxine STb active, puisque celle-ci, ayant une forme réduite, est dégradée dans le périplasme (Foreman *et al.*, 1995).

Finalement, une protéine membranaire externe, TolC, va permettre la sécrétion de STb. Cette protéine est également requise pour la sécrétion de plusieurs facteurs de virulence dont des toxines, des protéases, des lipases et des peptides antibactériens tel la colicin V (Koronakis *et al.*, 2004; Yamanaka *et al.*, 2008).

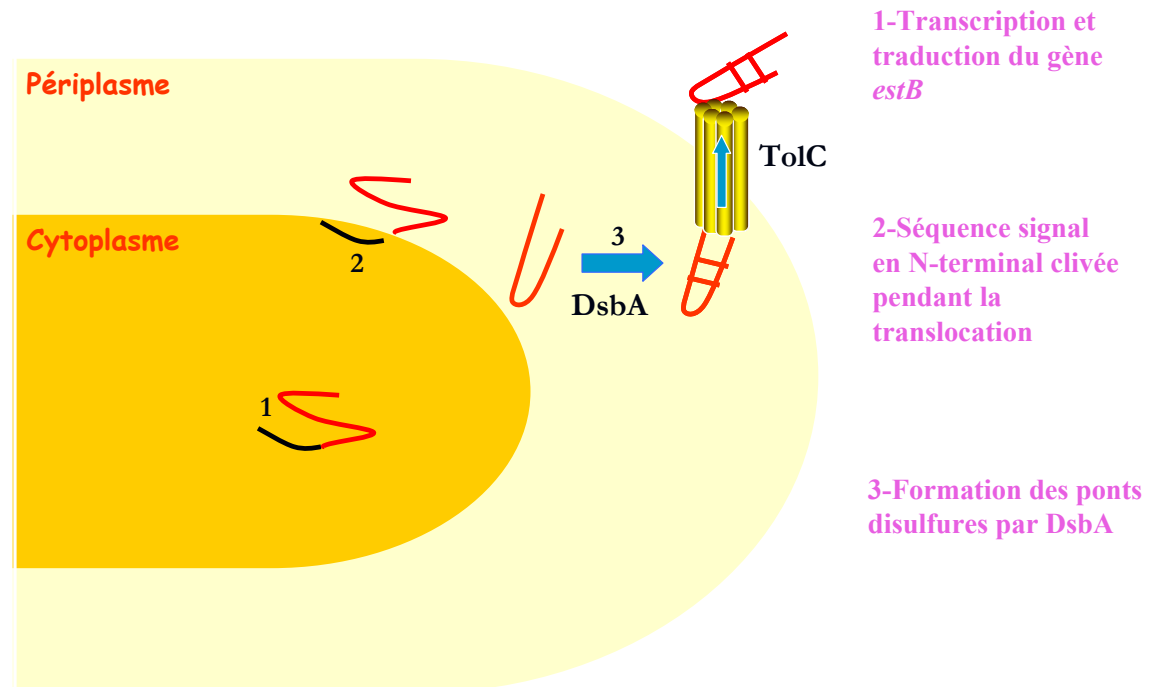


Figure 4: Maturation de la toxine STb, du cytoplasme jusqu'à sa sécrétion.

Récemment, une étude a révélé que MacAB participe à la sécrétion de la toxine. MacAB est un transporteur de type ABC qui interagit avec TolC (Kobayashi *et al.*, 2003; Kobayashi *et al.*, 2001). Le mécanisme exact par lequel MacAB participe à l'exportation de STb demeure inconnu jusqu'à maintenant. Les auteurs suggèrent que MacAB capture la toxine dans le périplasma et la transporte jusqu'au centre du canal formé par TolC (Figure 5) (Yamanaka *et al.*, 2008), puisqu'une autre étude récente démontre que la toxine est séquestrée dans le périplasma dans les souches TolC négatives (Yamanaka *et al.*, 2007). De plus, le groupe de Tikhonova a démontré que la protéine adaptatrice MacA est une sous-unité du transporteur MacAB, et qu'elle stimule l'activité ATPase de MacB (Tikhonova *et al.*, 2007).

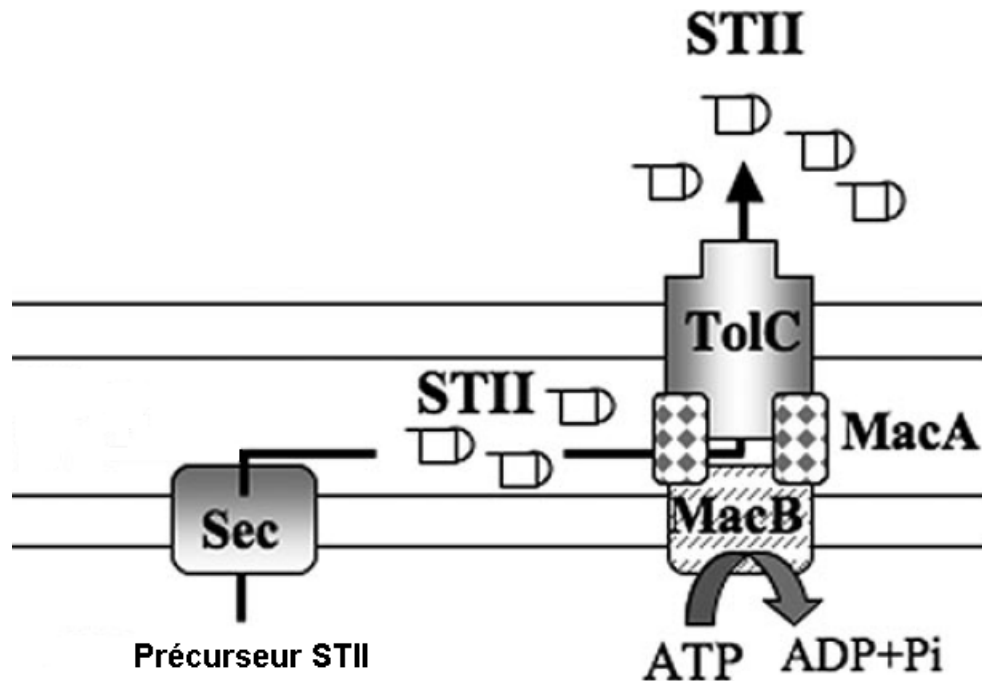


Figure 5: Modèle schématique de la sécrétion de la toxine STb impliquant le transporteur de type ABC (adapté de Yamanaka *et al.*, 2008)

Le fonctionnement classique du système de sécrétion type II (qui sécrète la toxine LT) implique le transport de produits relâchés dans le périplasme, ceux-ci sont transportés à nouveau à travers la membrane externe via le sécréton, un complexe de protéines multimériques (Gerard-Vincent *et al.*, 2002; Pugsley, 1993). Dans le cas de STb par contre, la toxine est exportée par le système MacAB-TolC, même si la machinerie sécrétrice, le système Sec, est responsable de sa translocation dans le périplasme. STb est donc sécrétée par un système unique qui diffère des mécanismes des autres toxines connues jusqu'à présent.

3.4 Structure tridimensionnelle

La toxine est composée de deux hélices- α antiparallèles séparées par une boucle riche en glycine. L'hélice alpha entre les acides aminés 10 et 22 est une région hydrophile, et les chaînes latérales des acides aminés Asp₈, His₁₂, Gln₁₅, Lys₁₈,

Glu₁₉, Lys₂₂ et Lys₂₃ sont exposées au solvant, (Sukumar *et al.*, 1995). La deuxième hélice alpha entre les résidus 38 et 44 est constituée d'acides aminés plutôt hydrophobes (Figure 6). La structure tertiaire de la toxine est stabilisée par deux ponts disulfures situés entre les résidus Cys₁₀ et Cys₄₈ et Cys₂₁ et Cys₃₉ (Okamoto K, 1993). Ces ponts disulfures sont essentiels à la toxicité de la toxine. L'absence d'un seul de ces ponts disulfures suffit à abolir son activité biologique. De plus, l'étude de Sukumar *et al.* (1995) montre que les acides aminés localisés entre les ponts disulfures sont responsables de l'activité biologique de la toxine, et que les sept premiers acides aminés n'ont aucune fonction liée à la structure ni à la toxicité. Des analyses de dichroïsme circulaire indiquent que le peptide STb natif comporte 73% d'hélices- α , 4% de structure β et 22% de structures apériodiques. D'ailleurs, la forme réduite de la toxine possède plutôt 20% d'hélices- α , 29% de structure β et 51% de régions apériodiques, montrant ainsi l'importance des ponts pour stabiliser la structure secondaire.

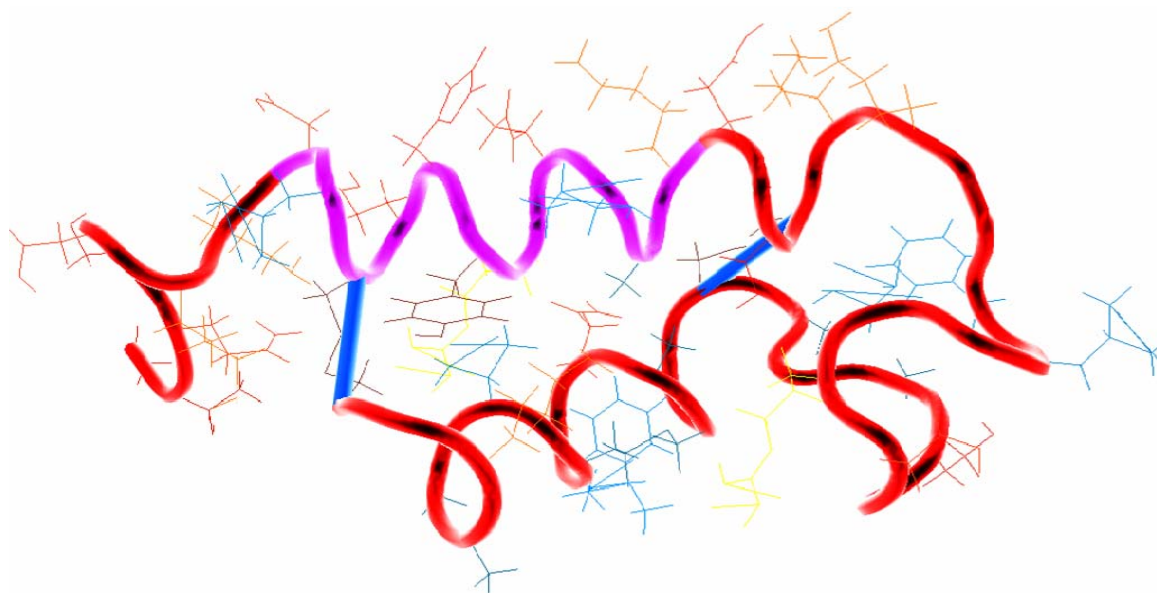


Figure 6: Structure tridimensionnelle de la toxine STb (programme Cn3D tiré de pubmed)

3.5 Mécanisme d'action

3.5.1 Oligomérisation

La toxine est capable de former une interaction protéine-protéine avec elle-même (Labrie *et al.*, 2001b). Des hexamères et des heptamères ont été observés sur gel d'électrophorèse suite à l'utilisation d'un agent pontant. Lorsque la toxine est traitée avec des agents réducteurs, cette interaction est abolie, suggérant alors que la toxine doit avoir une structure tridimensionnelle intacte afin de former ces oligomères. D'ailleurs, on observe également l'oligomérisation chez d'autres toxines. Par exemple, l'hémolysine- α de *Staphylococcus aureus* s'oligomérisent une fois insérées dans la membrane (Thelestam *et al.*, 1991). L'aérolysine sécrétée par *Aeromonas hydrophila* quant à elle, s'oligomérisent avant son insertion dans la membrane (van der Goot *et al.*, 1992).

3.5.2 Récepteur de la toxine

L'attachement de la toxine à des cellules cibles est la première étape menant à la sécrétion d'eau et d'électrolytes. L'interaction de la toxine avec des cellules épithéliales intestinales en culture a été observée par immunofluorescence (Chao and Dreyfus, 1997). Après la formation d'une association stable entre la toxine et les lipides de la membrane cellulaire, l'internalisation de STb dans le cytoplasme a aussi été observée dans cette même étude. Le sulfatide a été identifié comme récepteur de la toxine dans une autre étude (Rousset *et al.*, 1998).

Le sulfatide fait partie de la famille des glycosphingolipides et on le retrouve notamment, sur la surface des cellules épithéliales intestinales. Il est composé d'un céramide lié à un galactose sulfaté en position 3. Une constante de dissociation de 2.4 ± 0.61 nM a été récemment déterminée par résonance plasmonique de surface pour le sulfatide et la toxine STb (Goncalves *et al.*, 2008). Ceci démontre une forte affinité

entre la toxine et le sulfatide si on compare cette interaction avec les interactions connues des autres toxines. Par exemple, la toxine LT a une constante de dissociation de 0,57 nM avec son récepteur GM1 (MacKenzie *et al.*, 1997). La toxine est aussi capable d'interagir avec d'autres glycosphingolipides. Elle se lie aux 3-sulfolactosylcéramides (76%), aux glucocéramides (63%), aux galactocéramides (27%), ainsi qu'aux lactocéramides (24%) comparativement à la liaison au SFT (Beausoleil and Dubreuil, 2001).

3.5.3 Altérations cellulaires

L'entérotoxine STb peut également causer des lésions au niveau du jéjunum porcin (Whipp *et al.*, 1987). Ces lésions ont été observées après que des segments de jéjunum aient été traités avec le filtrat d'une culture d'*E. coli* exprimant la toxine. Ces lésions reflétaient une perte de cellules absorptives, expliquant alors la diminution de l'absorption d'eau et d'électrolytes par les entérocytes affectés par la toxine.

3.5.4 Internalisation

La première preuve démontrant l'internalisation de la toxine fut obtenue par le groupe de Dreyfus (Chao and Dreyfus, 1997). Les auteurs ont observé que la toxine, après attachement aux cellules épithéliales, s'intégrait dans la membrane des cellules. Ce phénomène était indépendant de la température, des réarrangements du cytosquelette, de l'énergie et de conditions hypertoniques. Ceci suggère donc que les processus tels l'endocytose clathrine-dépendante et clathrine-indépendante, l'internalisation par la voie caveolae ou par micropinocytose, ne sont pas responsables de l'internalisation de la toxine. Ils suggèrent la formation d'un complexe stable avec les lipides plutôt que l'internalisation cellulaire classique par un ligand. Ils suggèrent également que la toxine une fois associée à la membrane pénètre à travers la membrane et interagirait avec des protéines régulatrices telles les protéines G.

Labrie *et al.* (2002) ont aussi observé l'internalisation suivant l'attachement de STb aux cellules épithéliales d'intestin dans un modèle animal en marquant la toxine avec des particules d'or (Labrie *et al.*, 2002). Cette internalisation a été visualisée par microscopie électronique après 3 heures d'incubation, ce qui correspond avec le fait que la toxine a une activité maximale après 3 heures d'incubation (Hitotsubashi *et al.*, 1992). Par contre, le mécanisme par lequel STb est internalisée demeure inconnu.

3.5.5 Activation d'une protéine G

Des expériences *in vitro* ont indiqué que la toxine élève la concentration intracellulaire de calcium (Dreyfus *et al.*, 1993). Cette élévation de calcium peut être inhibée par la toxine pertussique, suggérant ainsi que STb agit sur une protéine G sensible à la toxine pertussique (G_{i3}), liée à un canal d'ions calcium dans la membrane. Cette augmentation de calcium intracellulaire déclencherait une cascade d'évènements menant à la sécrétion d'eau et d'électrolytes incluant l'activation d'une protéine kinase Ca^{++} -calmoduline dépendante II (CaMKII) (Dreyfus *et al.*, 1993), (Fujii *et al.*, 1997). Cette augmentation d'activité chez la CaMKII a été observée dans des segments ligaturés de souris. Un antagoniste de calmoduline et un inhibiteur de cette kinase ont réduit l'action de la toxine, suggérant son implication dans l'action de la toxine.

STb, comparativement à d'autres entérotoxines sécrétées par *E. coli*, n'est pas responsable de l'élévation de la concentration de cAMP ni de cGMP (Hitotsubashi *et al.*, 1992). Par contre, Hitotsubashi *et al.* ont été les premiers à observer une augmentation de prostaglandine E_2 (PGE_2) dans la lumière intestinale de souris, suite au traitement avec la toxine. On avait déjà observé l'augmentation du niveau de PGE_2 dans les fluides intestinaux lorsque l'on traite des lapins avec la toxine du choléra (Peterson and Ochoa, 1989). Ici, l'accumulation de fluide est à son maximum après 3 heures et 8 heures d'incubation avec la toxine STb et la toxine du choléra respectivement, et le niveau de PGE_2 est triplé lorsque les deux toxines sont

ajoutées. De plus, des inhibiteurs de cyclooxygénase, et donc de prostaglandines, comme l'aspirine et l'indométhacine, ont réduit significativement l'accumulation de fluides produits par STb. D'autres études *in vivo* ont par la suite confirmé cette formation de prostaglandine E₂, ainsi que le niveau d'acide arachidonique de façon dose-dépendante après traitement avec STb, (Fujii *et al.*, 1995; Harville and Dreyfus, 1995).

Tout comme la toxine cholérique, l'équipe de Dreyfus a reporté que STb élevait le niveau de sérotonine (5-HT₂) de façon dose-dépendante, en plus d'augmenter le niveau de prostaglandines (PGE₂) dans des segments ligaturés de rats (Harville and Dreyfus, 1995). Un niveau élevé de sérotonine joue un rôle dans le transport d'électrolytes et sur la sécrétion d'eau intestinale, sans pour autant modifier les niveaux de cAMP et de cGMP (Donowitz *et al.*, 1977; Kisloff and Moore, 1976). Cette action de la sérotonine est dépendante du niveau de calcium intracellulaire (Beubler *et al.*, 1986; Bolton and Field, 1977; Donowitz *et al.*, 1980). Par contre, la production de prostaglandines par STb n'est pas médiée par l'augmentation de sérotonine, puisque l'action d'un inhibiteur de sérotonine ne permet pas d'inhiber la production de PGE₂ complètement. Peterson et Whipp (1995) ont eux aussi mesuré les effets de la toxine, cette fois en utilisant des segments ligaturés de porc. La combinaison de la toxine cholérique et celle de la toxine STb a un effet synergique sur la quantité de fluides accumulés ainsi que sur la quantité de 5-HT relâchée dans la lumière intestinale, suggérant ainsi un mécanisme d'action différent. Ceci dit, la production de sérotonine démontre l'implication du système nerveux entérique dans la cascade d'évènements produite par STb (Harville and Dreyfus, 1995; Peterson and Whipp, 1995).

3.5.6 Effet sur le système nerveux entérique

L'implication de mécanismes nerveux dans le mode d'action de la toxine a aussi été étudiée (Eklund *et al.*, 1985). Des segments intestinaux de rats et de chats ont été exposés aux toxines STa et STb. L'hexaméthonium, l'atropine, la lidocaine et la

térodotoxine ont été utilisés afin de bloquer l'activité neuronale. Trois de ces substances ont diminué la sécrétion, et dans certains cas, ont même augmenté l'absorption. L'effet de l'atropine n'a par contre pas été constant. Certaines expériences ont montrés une diminution de l'absorption, tandis que d'autres n'ont pas montré d'effets. La raison exacte n'a pas pu être déterminée, mais les auteurs suggèrent que c'est peut-être lié au fait que STa et STb stimuleraient la sécrétion via deux mécanismes différents. L'hypothèse du mécanisme par lequel STa et STb induiraient le système nerveux entérique est la suivante : après attachement à leur récepteur sur les entérocytes, STa et STb libéreraient une substance des cellules intestinales qui activerait les neurones situés sous l'épithélium intestinal.

3.5.7 Perméabilisation membranaire

Chao et Dreyfus ont été les premiers à suggérer que la toxine perméabilisait la membrane cellulaire des cellules cibles lorsqu'ils ont observé l'attachement de la toxine aux vésicules de lipides suivi de la pénétration rapide dans les cellules intestinales (Chao and Dreyfus, 1999). Une autre étude a suggéré la perméabilisation membranaire par STb chez différents types cellulaires (Beausoleil *et al.*, 2002). Un modèle, utilisant des cellules en culture, la lignée CHO, a été développé dans cette étude afin d'évaluer la toxicité de STb. Dans ce modèle, les cellules traitées avec la toxine absorbaient le bleu de tryptan. Par contre, le test de viabilité MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), qui permet d'évaluer les modifications de l'activité métabolique des cellules en culture, n'a indiqué aucune mortalité cellulaire.

Une étude récente a évalué la capacité de la toxine à perméabiliser des vésicules de la membrane de la bordure en brosse d'un jéjunum porcin (Goncalves *et al.*, 2008). Ceci a été analysé par un essai fluorescent utilisant un marqueur de potentiel membranaire. STb perméabilise la membrane de façon non spécifique, possiblement par la formation de pores. De plus, puisque la perméabilisation était dose-dépendante, l'effet de STb est attribuable à son interaction avec le récepteur

plutôt qu'à un effet semblable à celui d'un détergent. Ce récepteur aiderait la toxine à s'insérer et ainsi former des pores dans la membrane, augmentant de cette façon la perméabilité. Cependant, il reste à déterminer le rôle de cette perméabilisation dans la diarrhée produite par STb.

3.5.8 Hypothèse du mécanisme d'action

Globalement, l'hypothèse du mécanisme d'action de STb est la suivante : tout d'abord la toxine s'oligomérisse avant son attachement à son récepteur. L'interaction à ce récepteur mène à son insertion dans la bicouche lipidique membranaire. C'est à ce moment que la toxine s'internaliserait à l'intérieur des cellules intestinales par la formation de pores, menant à l'activation de la protéine G_{i3} . Ensuite s'enchaînerait une cascade d'événements commençant par l'augmentation du niveau de calcium intracellulaire via un canal de calcium récepteur dépendant activant la protéine kinase Ca^{++} -calmoduline dépendante II (CaMKII) (Fujii *et al.*, 1997). Ceci pourrait à son tour activer la protéine kinase C et le CFTR. L'augmentation de calcium intracellulaire est responsable de la régulation de phospholipases (A2 et C), qui eux relâchent l'acide arachidonique des phospholipides membranaires. L'acide arachidonique serait donc responsable de la formation des sécrétagogues PGE_2 et sérotonine, menant à la diarrhée (Figure 7).

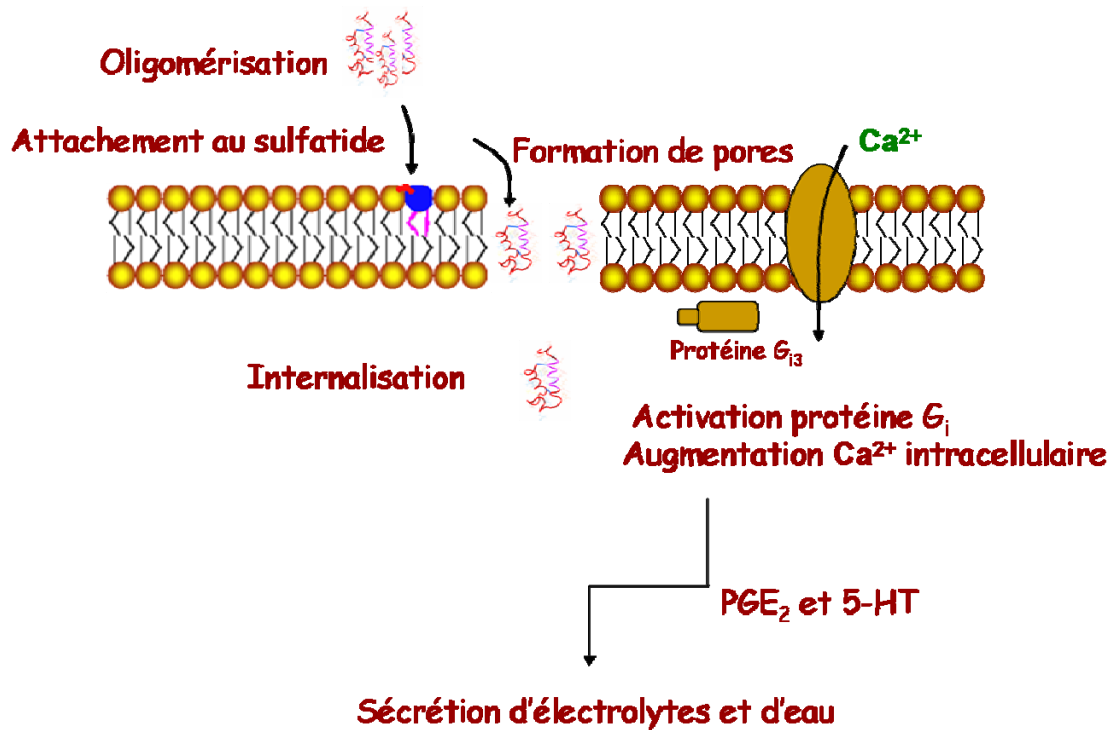


Figure 7: Illustration du mécanisme d'action suggérée pour la toxine STb

3.6 Études structure-fonction

Suite à des études de mutagenèse, il a été démontré que les acides aminés présents dans la boucle riche en glycine étaient importants pour l'attachement au sulfatide ainsi que la toxicité (Fujii *et al.*, 1994; Labrie *et al.*, 2001a; Sukumar *et al.*, 1995). Plus précisément, une mutation des lysines en position 22 et 23 réduit considérablement l'attachement au sulfatide. De plus, le double mutant K₂₂/K₂₃ en A₂₂/A₂₃ a un effet synergique sur la réduction de l'attachement et la toxicité. Le groupe de Fujii a également souligné l'importance de ces lysines dans la toxicité de STb (Fujii *et al.*, 1994). Les mutants K₂₂L et K₂₃T, ainsi que le double mutant K22I-K23N ont une activité toxique correspondant à 10% de l'activité toxique de la toxine sauvage (Fujii *et al.*, 1994). La mutation des glycines présentes dans la boucle mène également à une diminution de l'attachement au sulfatide. Ceci peut être expliqué par la flexibilité que les glycines apportent à la boucle. En mutant ces glycines, la boucle perd de sa flexibilité, rendant l'attachement plus difficile (Labrie *et al.*, 2001a).

L'arginine en position 29 joue un rôle dans l'attachement au sulfatide, et par conséquent sur la toxicité (Labrie *et al.*, 2001a; Sukumar *et al.*, 1995). Par contre, le changement de l'acide aminé aspartate en alanine ou valine en position 30 réduit la toxicité, cependant l'attachement semble être meilleur. Cela peut être dû au fait que le sulfatide porte un groupe sulfate anionique, et que l'aspartate porte une charge négative, ce qui peut engendrer une force répulsive. Donc, cette mutation peut favoriser une meilleure interaction entre la toxine et son récepteur (Labrie *et al.*, 2001a).

Des mutations dans l'hélice α hydrophobe ont également une répercussion sur la toxicité et l'attachement au sulfatide. Ces mutants (F₃₇K, I₄₁S, et M₄₂S) ont aussi perdu la capacité de former des oligomères (Labrie *et al.*, 2001a). La formation d'oligomères peut être due à la répulsion des résidus hydrophobes vis-à-vis de l'eau présente dans l'environnement. Donc les hélices α hydrophiles seraient exposées à l'environnement, tandis que les hélices hydrophobes seraient liées entre elles. La mutation de ces résidus hydrophobes diminuerait donc la répulsion, et la formation d'oligomères est donc abolie. En plus d'avoir perdu la capacité de former des oligomères, ces mutants présentent également une diminution dans l'attachement et l'activité toxique (Labrie *et al.*, 2001a). L'oligomérisation de la toxine semblerait donc être cruciale à l'activité toxique de STb. La Figure 8 indique les différentes mutations étudiées afin de déterminer la fonction de région et d'acides aminés spécifiques dans l'activité toxique de STb.

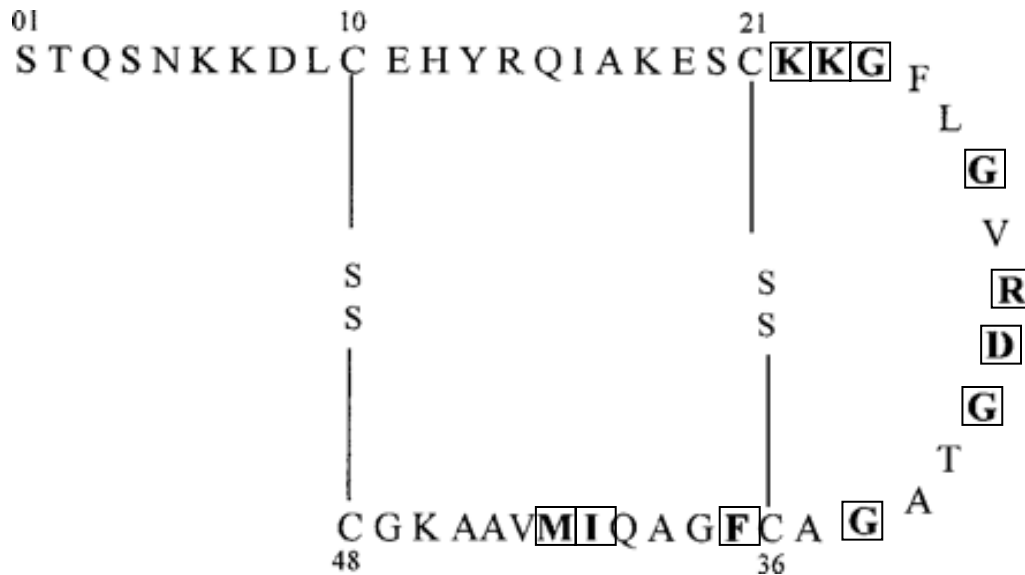


Figure 8: Structure secondaire de la toxine STb. Plusieurs mutants ponctuels de cette molécule ont été générés. Les acides aminés mutés sont encadrés.

3.7 Importance clinique

Comme mentionné précédemment, le gène codant pour la toxine STb a une prévalence très élevée. Une étude a révélé que plus de 50% des souches isolées de porc atteints de diarrhée aux États-Unis de 1999 à 2001 possédaient les gènes codant pour le fimbriae F4, ainsi que les toxines LT et STb (Francis, 2002). L'étude de Zhang *et al.* a montré que la toxine était présente dans les principaux pathotypes responsables de diarrhée post-sevrage chez le porcelet (F4/LT/STb, F4/LT/STb/EAST1 et F18/STa/STb/Stx2e) (Zhang *et al.*, 2007). Cela dit, puisqu'on retrouve plusieurs autres toxines en même temps que de STb chez les souches ETEC causant la diarrhée, il est difficile de déterminer l'effet réel de l'action toxique de STb.

Par contre, des études *in vivo* démontrent l'induction de la diarrhée causée par la toxine. Des souches STb-positive où STb est produite n'exprimant aucune autre toxine ni facteur de colonisation connues peuvent causer la diarrhée dans des porcs nouveaux-nés (Fairbrother *et al.*, 1989). Par contre, une étude de Whipp *et al.* montre

plutôt que l'expression de la toxine ne contribue pas significativement à la perte de poids chez le porc nouveau-né en comparant la pathogénicité d'une souche $F41^+/STb^+$ et $F41^+/STb^-$ (Whipp *et al.*, 1987). Une étude de Berberov montre que 60% des porcs inoculés âgés de neuf jours avec une souche $STb^+/EAST1^+$ ont développé une diarrhée sévère et une septicémie, comparativement à 100% des porcs inoculés avec une souche $LT^+/STb^+/EAST1^+$ dans un modèle gnotobiotique porcin (Berberov *et al.*, 2004). Ces résultats démontrent que les trois toxines semblent être exprimées conjointement dans les souches ETEC. Plus récemment, le groupe de Zhang a inoculé onze porcs de cinq jours avec une souche $F4^+/STb^+$ (Zhang *et al.*, 2007). Les symptômes présentés par les porcs étaient modérés (diarrhée modérée à nul). Ces résultats démontrent que l'effet de la toxine semble être faible lorsque cette dernière est inoculée à des porcs nouveaux-nés, mais que cet effet s'accroît avec l'âge du porc. Cela semble être dû à une activité élevée de trypsine chez le porc nouveau-né, à laquelle la toxine est très sensible (Whipp *et al.*, 1987).

Cependant, il serait improbable que la toxine n'ait aucun rôle dans la pathologie de la diarrhée porcine étant donné sa prévalence génétique élevée dans les souches ETEC. Son degré d'impact pourrait varier dépendamment de l'âge du porc, mais également à cause d'autres facteurs de virulence. Plusieurs études sur des modèles porcins sont nécessaires afin d'élucider son rôle dans la colibacillose.

3.8 Découverte d'un variant

Pour la première fois en 2003, un variant génétique de la toxine fut identifié. Ce variant avait deux changements en acide aminé : une mutation histidine/asparagine en position 12 et une autre mutation lysine/isoleucine en position 23. La première variation est localisée dans l'hélice α hydrophyle, où aucune étude structure-fonction n'a été réalisée jusqu'à maintenant (Fekete *et al.*, 2003).

3.8.1 Description du variant

Le gène codant pour ce variant était localisé sur un large plasmide, le pTC, isolé d'une souche porcine Ec2173. Cette souche provenait d'un porc dont le décès fut causé par la diarrhée post-sevrage. Les auteurs ont démontré la toxicité de cette souche dans des segments ligaturés du porcs et par le test du souriceau (Nagy and Fekete, 2005). Cette souche a été identifiée comme étant de sérotype O147 :K⁺, et de virotype STa⁺STb⁺Hy⁺F18ac⁺.

Le plasmide pTC possède un gène de résistance à la tétracycline, les gènes codant pour les toxines STa et STb ainsi que les gènes de mobilisation de plasmide puisque qu'on peut le transférer dans une souche K12 (Fekete *et al.*, 2003). Les auteurs ont nommé la séquence de 9872 pb où se trouvait *astA* et *estB* 'toxin-specific locus (TSL)'. Sur ce TSL se trouve également une région codant pour la transposase d'un élément IS1, ainsi qu'un fragment du gène tRNA *pheV* (Figure 9). De plus, les auteurs ont trouvé dans la séquence de 10 kb certain fragments similaires à des séquences importantes de gènes de virulence plasmidiques appartenant à d'autres pathogènes entériques tels des plasmides de virulence de différents pathotypes de *E. coli* (pO157, pB171) et *Shigella flexneri* (pW100, pWR501), ainsi que d'autres fragments similaires à un îlot de pathogénicité (PAI) I₅₃₆ de la souche *E. coli* 536 uropathogénique. Ce TSL a la capacité de se transposer dans un autre plasmide en tant que fragment de 40 kb. Tout ceci pris en compte, les auteurs ont désigné ce fragment de 40 kb contenant le TSL « PAI I₂₁₇₃ ».

Afin de déterminer la toxicité du plasmide pTC, des segments ligaturés de porcs ont été effectués avec des mutants ayant perdu le plasmide (Nagy and Fekete, 2005). Par contre, ces mutants n'ont pas perdu le plasmide pF18. Ces mutants n'ont montré aucun effet toxique malgré la présence des autres plasmides. Les auteurs ont donc conclu que le pTC et des plasmides pTC-'like' représentent probablement un des facteurs de virulence majeurs dans la diarrhée porcine.

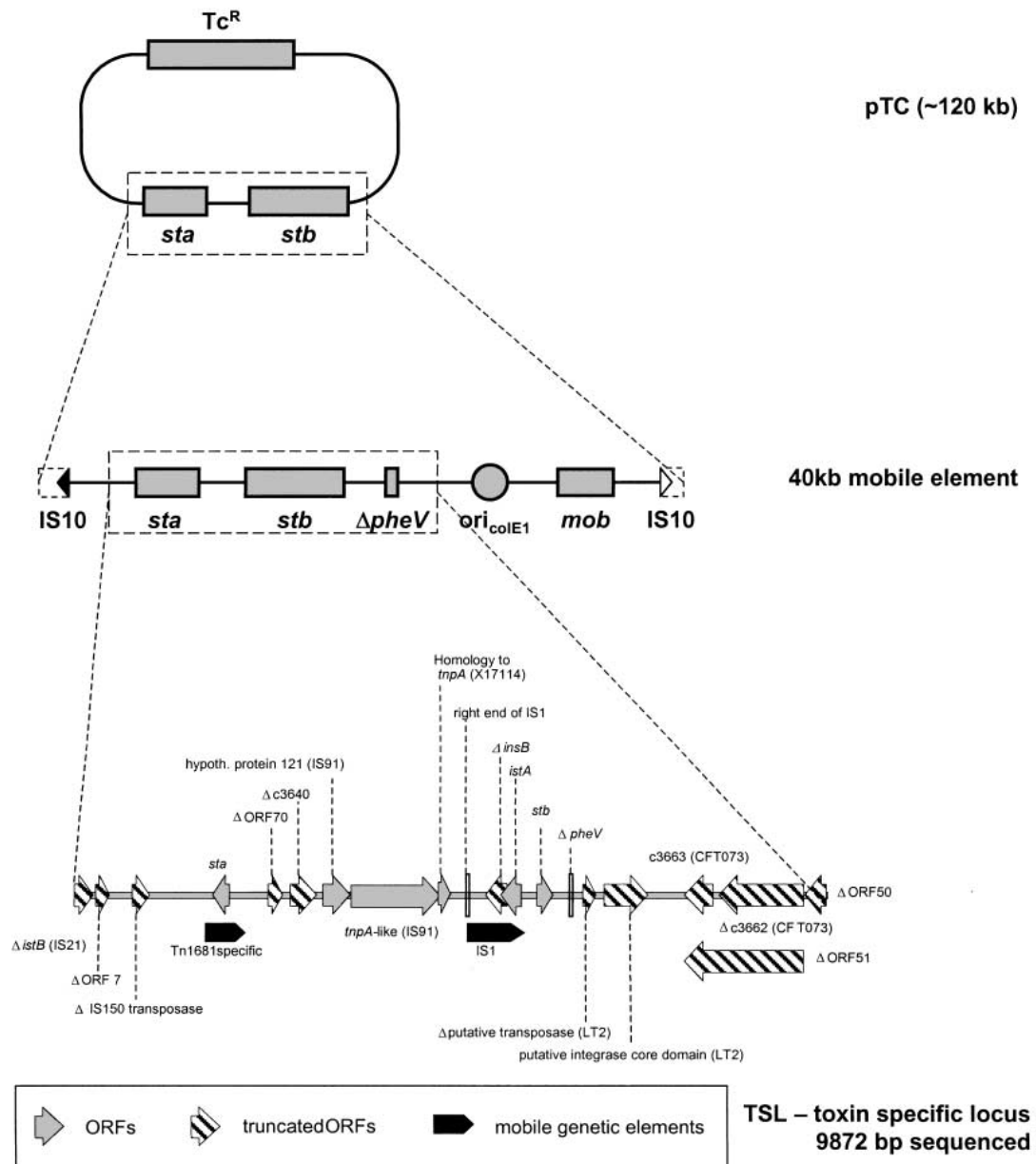


Figure 9: Organisation génétique du TSL du plasmide pTC (tiré de (Fekete *et al.*, 2003))

3.8.2 Présence de variants chez d'autres toxines retrouvées dans les souches ETEC

3.8.2.1 EAST1

Plusieurs toxines possèdent des mutations dans leur séquence génétique. Deux variants principaux de la toxine EAST-1 ont été identifiées, EAST1 17-2 et EAST1 O-42. La variation d'un seul acide aminé de la toxine a été détectée dans la

souche O-42 par rapport à la souche 17-2 (Savarino *et al.*, 1991). Ces deux souches ont également des séquences flanquantes qui diffèrent. La souche O-42 semble avoir une toxicité supérieure puisque cette souche a été capable d'induire la diarrhée chez des volontaires, et que la souche 17-2 en a été incapable (Nataro *et al.*, 1995). Une autre étude a comparé les deux variants via une chambre de Ussing avec une lignée cellulaire humaine T84 (Veilleux *et al.*, 2008). Les deux variants ont généré une sécrétion d'anions et cela à un niveau équivalent. Ces études étant contradictoires, l'effet de la mutation sur le niveau de toxicité d'EAST1 reste indéterminé. D'autres variants de la toxine ont également été détectés, mais ils semblent moins fréquents et leur toxicité n'a pas été évaluée (Menard and Dubreuil, 2002).

3.8.2.2 Stx2

Une autre toxine sécrétée par *Escherichia coli*, Stx2, a plusieurs variants génétiques dont Stx2c, Stx2d, Stx2e et Stx2f (Friedrich *et al.*, 2002). Stx2c et Stx2d sont produites par des souches STEC humaines, tandis que Stx2e est associée majoritairement aux souches porcines, malgré leur détection dans des souches STEC humaines. Stx2f, de son côté, a été isolée d'une souche STEC provenant d'un pigeon. Ces différents variants ont une homologie génétique allant de 63,4 à 99,7% pour la sous-unité A et de 75,4% à 95,2% pour la sous-unité B. (Pierard *et al.*, 1998; Schmidt *et al.*, 2000; Schmitt *et al.*, 1991; Weinstein *et al.*, 1988). Une étude de Friedrich *et al.* démontre que les souches STEC avec différents variants n'auront pas la même capacité à causer le SHU; les souches STEC produisant stx2 ou stx2c ont une virulence supérieure à celles qui produisent stx2d ou stx2e et auront une tendance élevée à causer le SHU (Friedrich *et al.*, 2002).

3.8.3 Description du projet

Fekete *et al.* ont révélé pour la première fois la présence d'un variant de la toxine STb (Fekete *et al.*, 2003). L'étendue de ce variant ainsi que son implication

dans la diarrhée chez les porcs ne sont pas connues. Puisque d'autres toxines possèdent plusieurs variants de leur séquence d'ADN, nous voulions déterminer si un ou des variant(s) étai(en)t présent(s) dans les souches ETEC isolées du Québec et d'étudier la fréquence de ce(s) dernier(s). De plus, nous avons déterminé si ce(s) variant(s) étai(en)t associé(s) à un virotype ou facteurs de virulence particuliers.

Suite à ces résultats, nous avons comparé la toxine sauvage avec ce(s) variant(s) à différents niveaux pour déterminer si ce(s) dernier(s) auraient une virulence altérée par rapport à la toxine sauvage. Premièrement, nous avons déterminé la structure secondaire et la stabilité de cette structure lorsque soumise à un changement de température. Ensuite, l'attachement du/des variant(s) et de la toxine sauvage à son récepteur, le sulfatide, a été quantifié. Et finalement, nous avons étudié l'internalisation de la toxine sauvage et du/des variant(s) dans la lignée cellulaire IPEC-J2.

MÉTHODOLOGIE ET RÉSULTATS

Article 1:

**Heterogeneity of *Escherichia coli* STb enterotoxin isolated from
diseased pigs**

(Publié dans Journal of Medical Microbiology, 2008 Jul;57(Pt 7):887-90.)

Heterogeneity of *Escherichia coli* STb enterotoxin isolated from diseased pigs

Christine Taillon, Eric Nadeau, Michaël Mourez and J. Daniel Dubreuil*

Centre de Recherche en Infectiologie Porcine (CRIP), Faculté de médecine
vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada, J2S 7C6.

Running title : *E. coli* STb variant

*Corresponding author.

Mailing address : Département de Pathologie et Microbiologie, Faculté de Médecine
Vétérinaire,

Université de Montréal, 3200 rue Sicotte, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada, J2S 7C6.

Phone : (450) 773-8521 ext. 18433. Fax : (450) 778-8108

Summary

To investigate the presence and frequency of *estB* variant(s), a collection of 100 STb-positive enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) strains isolated from 1980 to 2007 inclusively and randomly selected from diseased pigs in Québec, Canada, was analysed. A wide diversity of virulence gene profiles (virotypes) was detected in the strain collection. The *estB* gene was amplified by PCR using primers designed from the signal sequence and the C-terminal end, and the amplified fragment was sequenced using the forward primer. The translated DNA sequence revealed a His₁₂—> Asn change in 23 of the 100 ETEC isolates tested. The STb-variant strains were observed throughout the sampling period covered in the study. No other STb-variant type was found in this study. All 23 variant strains were also positive for the STa enterotoxin and were resistant to tetracycline, as for strain 2173. The STb variant was associated with Stx2-positive strains (5/6) and STa : STb strains that did not harbour any of the tested porcine fimbrial adhesions (13/17). The remaining variant strains were associated with fimbriae F4 (1/40), F5 (1/6), F6 (1/1) and F18 (2/7; excluding F18 : Stx2 strains).

Introduction

Severe diarrhea in humans and animals are often the result of *Escherichia coli* infections. Out of the six pathotypes described for *E.coli*, enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) are one of the most important agents of severe diarrhea in animals such as calves and pigs (Nagy and Fekete, 2005). ETEC produce several virulence factors as, for example, F4 and F18 fimbriae and the adhesin involved in diffuse adherence (AIDA) which mediate bacterial adherence to the intestine, and heat-labile (LT) and heat-stable enterotoxins (STa and STb) which cause diarrhea. STb is mostly associated with porcine strains, although it has been found in human isolates (Lortie et al., 1991; Okamoto K, 1993). This toxin is synthesized as a mature 48 amino acid peptide composed of two antiparallel alpha-helices separated by a glycine-rich loop (Sukumar et al., 1995). It contains two disulfide bonds which stabilize the peptide's tertiary structure, and both of these bonds are crucial for secretion and toxicity (Arriaga et al., 1995; Dreyfus et al., 1992; Okamoto et al., 1995; Sukumar et al., 1995). Likewise, the charged amino acid present in the glycine-rich loop also appears important for enterotoxicity, as are the hydrophobic residues present in the hydrophobic alpha-helix. In fact, mutations of these residues strongly inhibited both binding to its receptor and toxic activity in rat ligated intestinal loops (Labrie et al., 2001a). The hydrophobic alpha-helix was also shown to be involved in the oligomerization of the toxin (Labrie et al., 2001b).

In a recent study by Zhang and coworkers, 72.6% of 304 *E. coli* isolates from diarrheic pigs in the United States of America possessed the STb enterotoxin gene (Zhang et al., 2007), indicating that STb toxin is a highly prevalent toxin. No variation in the nucleotide sequence of STb had been identified prior to 2003, when Fekete and coworkers reported a variant of the toxin. This variant had two amino acid changes from His₁₂ to Asn and Lys₂₃ to Ile. The variant was isolated from an F18-positive ETEC, strain 2173, isolated from the small intestine of a weaned pig that died from post-weaning diarrhea. They also showed that this STb variant was encoded along with STa enterotoxin on a pathogenicity island (PAI₂₁₇₃) present on a plasmid (pTC₂₁₇₃) which also encoded the *tetB* gene conferring tetracycline resistance.

In the present study, a collection of 100 STb-positive ETEC strains, isolated from diseased pigs from 1980 to 2007 inclusively, was analyzed to determine the frequency and the distribution of STb variant(s), if present, throughout the 28-year period and for various ETEC virotypes.

Materials and methods

Bacterial strains. A total of 100 *E. coli* STb-positive strains were randomly selected from the *E. coli* culture collection of the Reference laboratory for *Escherichia coli* (EcL), part of the Diagnostic services of the Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada. Isolates had been recovered from samples of nursing or weaned pigs from 1980 to 2007, inclusively. Farms of origin of pigs were distributed throughout the various regions of Québec, Canada. The *estB* gene encoding for the heat-stable toxin b (STb), was identified using colony hybridization and serotyping was performed by standard techniques using a slide agglutination test with antisera produced in rabbits (Harel et al., 1991). Strains were stored at -80°C in tryptic soy broth (TSB) with 10% glycerol and were plated on tryptic soy agar (TSA) supplemented with 5% sheep blood before testing.

Virotyping using colony hybridization. Strains were tested for the following virulence or putative virulence factors using colony hybridization as previously described (Harel et al., 1991): heat-labile toxin (LT), heat-stable toxin a (STa), heat-stable toxin b (STb), enteroaggregative *E. coli* heat-stable enterotoxin 1 (EAST1), porcine attaching and effacing associated protein (Paa), adhesin involved in diffuse adherence (AIDA), Shiga toxins 1 and 2 (Stx1 and Stx2), *E. coli* attaching-and-effacing factor (EAE) and fimbriae F4 (K88), F5 (K99), F6 (987P), F17, F18 and F41. DNA probes were either derived from recombinant plasmids or from PCR products (Fecteau et al., 2001; Ngeleka et al., 2003).

Isolation, amplification, and sequencing of DNA. Total bacterial DNA was isolated by means of the DNeasy tissue system kit (Qiagen, ON, Canada) according to the manufacturer's instructions. The *estB* gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR) using the following primers: 5'CCACTGGTATAAGTTTTATTGCTTATAG and 5'TTAGCATCCTTTTGCTGCA. PCR were carried out in a total reaction volume of 45 µl in a Biometra T3 Thermocycler (Biometra, Germany) containing 2,78 mM of MgCl₂, 0,33 mM of each primer, 280 µM of each deoxynucleoside triphosphate, 2 U of *Taq* recombinant polymerase (Invitrogen) and 1,5 µl of template. The PCR cycle program consisted of initial denaturation at 94°C for 5 min, followed by 30 cycles of denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 55°C for 30 s, and extension at 72°C for 30 s, followed by a final extension at 72°C for 5 min. The PCR product was resolved by electrophoresis on a 3% agarose gel electrophoresis in 1× Tris-borate-EDTA (TBE) buffer along with 1-kbp DNA ladder as marker. Sequencing was done at the Faculté de Médecine Vétérinaire (Saint-Hyacinthe, Québec, Canada) using an ABI 310 (Applied Biosystems) using Big dye Terminator.

Tetracycline susceptibility. The tetracycline susceptibility of *E. coli* isolates was determined by the Kirby-Bauer disk diffusion method (Bauer et al., 1966). Readings were performed according to the NCCLS guidelines (approved standard M2-A4, 1990).

Results

The *estB* gene coding for STb toxin was amplified and sequenced for the 100 tested strains. The STb gene sequence was identical to the sequence originally described by Lee et al. (Lee et al., 1983) in 77 strains. The remaining 23 strains differed from the previously described sequence (wildtype STb) by one base at the 34th codon position (CAT to AAT), resulting in a change in the deduced amino acid residue at position 12 (His to Asn). This variant was observed in strains dating from 1980 through 2007, and was associated with specific virotypes found in ETEC (Table 1). These 23 variant strains were determined to be resistant to tetracycline. The STb variant was mainly associated with STa:STb strains harbouring no tested porcine fimbriae (13/23). Serotyping revealed that 10 of these 13 STa:STb variant strains belonged to O?:K48 group, while the three others were not typeable (Table 1). Thus, the most common strain isolated with the STb variant was STa:STb:O?:K48.

We assessed if the presence of individual toxin genes (STa, Stx2, LT and EAST1) could be correlated with the presence of wildtype or variant STb (Table 2). Five of the six Stx2-positive strains (83.3%) were associated with the STb variant and the frequency of Stx2 was higher in the strains harboring STb variant. Thus, there is a correlation between the presence of Stx2 and that of STb variant. Inversely, LT and EAST1 toxins were more often associated with the STb wildtype sequence (94% and 87.1%, respectively), and the frequency of LT and EAST1 was higher in the strains harboring wildtype STb. Thus, there is a correlation between the presence of EAST1

or LT and wildtype STb. All 23 STb-variant ETEC strains possessed the STa enterotoxin while only 28.5% of wildtype STb-positive ETEC strains possessed STa. However, an equal number of STa-positive strains were found with wildtype STb gene or its variant. There is therefore a weaker correlation between the presence of STa and that of STb variant.

Next, we assessed if the presence of individual fimbrial genes (F4, F18, F5, F6) could be correlated with the presence of wildtype or variant STb (Table 2). A total of 40 STb-positive strains were also positive for the F4 fimbriae. F4-positive strains harboring different combinations of enterotoxins (STa, STb, LT and/or EAST1), with or without Paa, are classic causes of post-weaning diarrhea (Fairbrother et al., 2005). However, the STb variant was found in only 1 (2.5%) of F4-positive strain. Thus the presence of F4 was strongly correlated with that of wildtype STb. In fact, 97.5% of the F4-positive strains were associated with wildtype STb and 50.6% of the strains positive for wildtype STb also had F4 whereas this frequency drops to 4.3% for strains positive for STb variant. A total of 11 strains of the collection were positive for the F18 fimbriae. Five of these strains showed the Asn₁₂ variation, corresponding to 21.7% of the STb-variant strains. None of the other fimbrial genes exhibited such a correlation with wildtype or variant STb.

Concerning the other virulence factors involved in adherence of ETEC to host cells (Paa and AIDA), both were correlated with the presence of wildtype STb, as

85.2% or 90.3% of strains positive for Paa or AIDA, respectively, were associated with wildtype STb (Table 2).

Discussion and conclusions

In this study, we screened a total of 100 ETEC strains for possible variants of the STb enterotoxin gene. Unexpectedly, we found 23 STb-variant strains, all bearing a unique variation at codon 34 and no other variant type was observed. The observed modification is responsible for a change of His₁₂ to Asn. The same change was observed in strain 2173 by Fekete et al. (2003), although in strain 2173 there was a second mutation reported at position 23 (see the appendix). The change observed in our study is located in the amphipathic helix of the toxin, a highly hydrophilic region. The side chain of His₁₂ points to the solvent (Sukumar et al., 1995) and thus could be involved in receptor recognition and/or toxicity. Studies using a point mutation approach determined the role of some amino acid residues in toxicity and binding of STb to its receptor (Dreyfus et al., 1992; Fujii et al., 1991; Labrie et al., 2001a). However, the histidine at position 12 has not been investigated so far. Thus, we cannot hypothesize on the effect of the amino acid substitution found in the variant identified in our study.

It appears that the STb variant is associated with peculiar ETEC virotypes. The STb variant was associated with STa-positive ETEC strains, since all of the 23 variants also hybridized with STa enterotoxin gene. Most of the ETEC strains positive for the STb variant were associated with two ETEC groups, STa- and STb-positive strains harboring no tested porcine fimbriae, and Stx2-positive strains. Stx2-positive strains also positive for one or a combination of enterotoxins are also called

ETEC/STEC (shiga-toxin producing *E. coli*) strains, and are responsible for edema disease and/or diarrhea (Fairbrother et al., 2005). STa:STb strains without porcine-associated fimbriae are less characterized and could be associated with diarrhea since this type of ETEC strains was isolated from diarrheic pigs (John M. Fairbrother, EcL laboratory, Personal communication). The STb variant was not associated with F4-positive ETEC, these strains being the main cause of post-weaning diarrhea in pig production. Classical post-weaning diarrhea-associated F4-positive ETEC generally harbor at least STb and LT enterotoxins and are associated with serogroup O149 (Fairbrother et al., 2005). In the current study, the only F4-positive strain in which the STb variant was detected was not a classical post-weaning diarrhea associated ETEC strain since it was a STa-, STb- and F4-positive strain but negative for LT.

As all 23 variant strains were STa positive and resistant to tetracycline, as also observed by Fekete et al. (2003), it could indicate that the observed variant is also present on the pTC₂₁₇₃ plasmid where STb, STa and resistance to tetracycline are found. This could be the result of a selection due to a preferred colonization of swine by strains carrying the plasmid and the ensuing development of enteric diseases.

In conclusion, we demonstrated that the frequency of a STb variant, identified in this study, is quite high and distributed in diverse ETEC virotypes, but mainly in STa:STb:Stx2-positive ETEC and STa:STb ETEC harboring no porcine associated fimbriae. It would be interesting to determine the impact of this genetic variation on the toxicity of the STb variant *in vivo*.

Acknowledgements

This work was supported by grant to J.D. Dubreuil from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada, by the Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies. C. Taillon received a grant from the Centre de Recherche en Infectiologie Porcine (CRIP). We thank Manon Salvas for DNA sequencing.

References

- Arriaga, Y. L., Harville, B. A. & Dreyfus, L. A. (1995).** Contribution of individual disulfide bonds to biological action of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin B. *Infect Immun* **63**, 4715-4720.
- Bauer, A. W., Kirby, W. M., Sherris, J. C. & Turck, M. (1966).** Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol* **45**, 493-496.
- Dreyfus, L. A., Urban, R. G., Whipp, S. C., Slaughter, C., Tachias, K. & Kupersztoch, Y. M. (1992).** Purification of the STb enterotoxin of *Escherichia coli* and the role of selected amino acids on its secretion, stability and toxicity. *Mol Microbiol* **6**, 2397-2406.
- Fairbrother, J. M., Nadeau, E. & Gyles, C. L. (2005).** *Escherichia coli* in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies. *Anim Health Res Rev* **6**, 17-39.
- Fecteau, G., Fairbrother, J. M., Higgins, R., Van Metre, D. C., Pare, J., Smith, B. P., Holmberg, C. A. & Jang, S. (2001).** Virulence factors in *Escherichia coli* isolated from the blood of bacteremic neonatal calves. *Vet Microbiol* **78**, 241-249.
- Fekete, P. Z., Schneider, G., Olasz, F., Blum-Oehler, G., Hacker, J. H. & Nagy, B. (2003).** Detection of a plasmid-encoded pathogenicity island in F18+ enterotoxigenic and verotoxigenic *Escherichia coli* from weaned pigs. *Int J Med Microbiol* **293**, 287-298.
- Fujii, Y., Hayashi, M., Hitotsubashi, S., Fuke, Y., Yamanaka, H. & Okamoto, K. (1991).** Purification and characterization of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II. *J Bacteriol* **173**, 5516-5522.
- Harel, J., Lapointe, H., Fallara, A., Lortie, L. A., Bigras-Poulin, M., Larivière, S. & Fairbrother, J. M. (1991).** Detection of genes for fimbrial antigens and enterotoxins associated with *Escherichia coli* serogroups isolated from pigs with diarrhea. *J Clin Microbiol* **29**, 745-752.
- Labrie, V., Beausoleil, H. E., Harel, J. & Dubreuil, J. D. (2001a).** Binding to sulfatide and enterotoxicity of various *Escherichia coli* STb mutants. *Microbiology* **147**, 3141-3148.
- Labrie, V., Harel, J. & Dubreuil, J. D. (2001b).** Oligomerization of *Escherichia coli* enterotoxin b through its C-terminal hydrophobic alpha-helix. *Biochim Biophys Acta* **1535**, 128-133.

Lee, C. H., Moseley, S. L., Moon, H. W., Whipp, S. C., Gyles, C. L. & So, M. (1983). Characterization of the gene encoding heat-stable toxin II and preliminary molecular epidemiological studies of enterotoxigenic *Escherichia coli* heat-stable toxin II producers. *Infect Immun* **42**, 264-268.

Lortie, L. A., Dubreuil, J. D. & Harel, J. (1991). Characterization of *Escherichia coli* strains producing heat-stable enterotoxin b (STb) isolated from humans with diarrhea. *J Clin Microbiol* **29**, 656-659.

Nagy, B. & Fekete, P. Z. (2005). Enterotoxigenic *Escherichia coli* in veterinary medicine. *Int J Med Microbiol* **295**, 443-454.

Ngeleka, M., Pritchard, J., Appleyard, G., Middleton, D. M. & Fairbrother, J. M. (2003). Isolation and association of *Escherichia coli* AIDA-I/STb, rather than EAST1 pathotype, with diarrhea in piglets and antibiotic sensitivity of isolates. *J Vet Diagn Invest* **15**, 242-252.

Okamoto, K., Baba, T., Yamanaka, H., Akashi, N. & Fujii, Y. (1995). Disulfide bond formation and secretion of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II. *J Bacteriol* **177**, 4579-4586.

Okamoto, K., Fujii, Y., Akashi, N., Hitotsubashi, S., Kurazono, H., Karasawa, T., & Takeda, Y. (1993). Identification and characterization of heat-stable enterotoxin II-producing *Escherichia coli* from patients with diarrhea. *Microbiol Immunol* **37**, 411-414.

Sukumar, M., Rizo, J., Wall, M., Dreyfus, L. A., Kupersztich, Y. M. & Gierasch, L. M. (1995). The structure of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin b by nuclear magnetic resonance and circular dichroism. *Protein Sci* **4**, 1718-1729.

Zhang, W., Zhao, M., Ruesch, L., Omot, A. & Francis, D. (2007). Prevalence of virulence genes in *Escherichia coli* strains recently isolated from young pigs with diarrhea in the US. *Vet Microbiol* **123**, 145-152.

Tables

Table 1: Incidence of STb variant His₁₂ to Asn in porcine *E. coli* strains.

Virotypes*	No. of strains tested	No. of STb variants	OK group†
F4:LT:STa:EAST1 (Paa)	10	0	
F4:LT:Paa:EAST1 (AIDA)	10	0	
F4:LT (EAST1, AIDA)	17	0	
F4 (EAST1, AIDA, Paa)	2	0	
F4:STa	1	1	O149
F18:Stx2 (LT, STa, EAST1, AIDA, Paa)	4	3	O149, O?:KV17, NT
Stx2 (LT, STa, EAST1 AIDA, Paa)	2	2	O141, NT
F18 (LT, STa, EAST1, AIDA, EAE)	7	2	O157 (2)
F5:STa	6	1	O149
F6:STa:EAST1:Paa	1	1	O9
STa (EAST1, AIDA, Paa)	18	13	O?:K48 (10), NT (3)
LT (EAST1, AIDA), and EAST1:AIDA (Paa), and AIDA	22	0	
Total	100	23	

*Virulence factor profile of STb-positive strains. The presence or absence of virulence factor(s) is indicated in parentheses. Strains were tested for the following virulence factors: LT, STa, STb, EAST1, Paa, AIDA, Stx1 and Stx2, EAE and fimbriae F4, F5, F6, F17, F18 and F41.

†Only strains with the His₁₂→Asn variant were tested for the OK group. The number of strains with the OK group is given in parentheses. NT, Non-typable.

Table 2: Association of wildtype STb and STb variant strains with virulence factors.

Virulence factor *	STb wt (%)†	STb variant (%)‡
STa (45)	22 (28.5) 48.9	23 (100) 51.1
Stx2 (6)	1 (1.3) 16.7	5 (21.7) 83.3
LT (50)	47 (61) 94	3 (13) 6
EAST1 (70)	61 (87.1) 87.1	9 (39.1) 12.9
F4 (40)	39 (50.6) 97.5	1 (4.3) 2.5
F5 (6)	5 (6.49) 83.3	1 (4.3) 16.7
F6 (1)	0 (0) 0	1 (4.3) 100
F18 (11)	6 (7.8) 54.5	5 (21.7) 45.5
Paa (27)	23 (29.9) 85.2	4 (17.4) 14.8
AIDA (31)	28 (36.4) 90.3	3 (13) 9.7

*The total number of strains positive for the virulence factor is shown in parentheses.

†The percentage of the 77 wild-type STb strains is shown in parentheses and the percentage of wild-type STb strains with the virulence factor indicated is in bold.

‡The percentage of the 23 STb-variant strains is shown in parentheses and the percentage of STb-variant strains with the virulence factor indicated is in bold.

Article 2:

Biochemical and biological characterisation of *Escherichia coli* STb His¹² to Asn variant

(en préparation pour Microbes and Infection)

**Biochemical and biological characterisation of *Escherichia coli* STb
His¹² to Asn variant**

Christine Taillon¹, Mark A. Hancock², Michaël Mourez¹, and J. Daniel Dubreuil*¹

¹Département de pathologie et microbiologie, Faculté de médecine vétérinaire,
Université de Montréal, Québec, Canada; ²Sheldon Biotechnology Centre, McGill
University, Québec, Canada

*Corresponding author.

Mailing address : Département de Pathologie et Microbiologie, Faculté de Médecine
Vétérinaire, Université de Montréal, 3200 rue Sicotte, Saint-Hyacinthe, Québec,
Canada, J2S 7C6.

Phone : (450) 773-8521 ext. 18433. Fax : (450) 778-8108

Abstract

We recently identified a variant of *Escherichia coli* STb toxin by PCR amplification of clinical isolates obtained from diseased pigs. The variant differed by only one amino acid at position 12 from His to Asn. This change was observed in 23 of the 100 randomly selected enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) isolates tested. There was a positive correlation between the presence of the STa enterotoxin and the STb variant. As the variant represented a high percentage of the ETEC strains tested, we were interested in determining if the single amino acid change results in altered biological characteristics of the toxin. Circular dichroism analysis revealed that the secondary structure of the variant was similar to wildtype and that their thermal stabilities were similar. Surface plasmon resonance showed that the variant possessed a reduced binding affinity for sulfatide receptor compared to wildtype toxin. A flow cytometry-based internalization assay showed that the variant toxin is more internalized into epithelial intestinal cells than the wildtype strain. However, this difference was minor. Overall, our results indicate that while wildtype STb and the variant share similar structural properties, modest differences exist in their internalization. This may be the result of altered receptor affinities.

Introduction

Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) is a major cause of human diarrhea in young children of third world countries, as well as travellers world-wide. ETEC also causes major financial losses in the farming industry as is responsible for diarrhea in cattle and pigs [1]. STb is one of many toxins secreted by ETEC that mediate fluid secretion resulting in diarrhea. This toxin is composed of 48 amino acids and has a molecular weight of 5.2 kDa [2]. The tridimensional structure of STb is composed of two α -helices separated by a glycine-rich loop; one helix is amphipathic (residues 10-22) and the other is hydrophobic (residues 21-36). Two disulfide bridges maintain a hairpin structure [3]. The toxin has the ability to form oligomers, which is thought to occur before receptor binding [4]. STb has been shown to bind to sulfatide, a glycosphingolipid present on epithelial cells of the pig jejunum [5]. An apparent equilibrium dissociation constant (K_D) of $2-6 \pm 1.5$ mM for the STb-sulfatide interaction was determined [6].

After binding to its receptor, the STb toxin activates a G protein which in turn activates a reaction cascade leading to diarrhea. The cascade involves the elevation of intracellular calcium concentration and production of prostaglandin E_2 (PGE₂) and 5-hydroxytryptamine (5-HT) [7-10]. The mechanism by which the toxin activates the G-protein is unclear. However, STb has been shown to permeabilize brush border membrane vesicles from pig jejunum by forming non specific pores [11]. The interaction of the toxin with epithelial cells has also been studied in T84 and HT29 human cell lines [12]. Following attachment of the toxin, the cells treated with an acidic saline solution resulted in removal of surface-bound toxin. Despite this treatment, almost 50% of the bound toxin remained associated with the plasma

membrane and/or was internalized within the cells. Moreover, another study determined that STb is internalized into epithelial intestinal cells following injection in rat intestinal loops [13]. The precise cellular target of the toxin remains unknown. Overall, these studies suggest that STb toxin may form pores after receptor binding and is then internalized into the cells, thereby activating the G- protein [14].

Recently, a variant of STb was observed in about 25% of the ETEC strains tested from pig isolates in Québec, Canada [15]. The variant was characterized by a single amino acid change (His¹² to Asn) within the amphipathic alpha-helix which has a strong membrane association potential [3, 16]. Mutagenesis studies have shown that amino acids present in the glycine rich loop are important for binding to the receptor, as well as toxicity [17-19]. The importance of the hydrophobic alpha-helix in the formation of oligomers was also demonstrated as mutations in this region render STb unable to form oligomers, thereby resulting in poor receptor binding and low toxicity. Nevertheless, the exact function of the hydrophilic alpha-helix remains unresolved. Thus, the biological significance of mutations within the hydrophilic alpha-helix, as observed in the STb variant, is unclear.

The present study was conducted to compare the biochemical and biological properties of wildtype and variant STb. A variety of experimental approaches demonstrate that while wildtype and variant STb share similar structural properties, functional differences in receptor binding and intestinal cell internalization were detectable.

Materials and methods

2.1 Oligonucleotide-directed mutagenesis and DNA sequencing.

Oligonucleotide-directed site-specific mutagenesis was performed using the QuikChange® II Site-Directed Mutagenesis Kit from Stratagene. Forward (TCAAATAAAAAAGATCTGTGCGAAAATTATAGACAAATAGCCAAGGAAA GT) and reverse (ACTTTCCTTGGCTATTTGTCTATAATTTTCGCACAGATC TTTTTTATTTGA) primers used to generate point mutations were synthesized by Operon Technologies (Alameda, CA, USA). The plasmid pMal STb, already described [20] served as DNA template for the PCR reactions performed (Biometra T3 Thermocycler, Biometra, Germany; 5 µl of 10X reaction buffer, 50 ng of template, 125 ng of each primer, 1 µl of dNTP mix, ddH₂O to a final volume of 50 µl and 1 µl of 2.5 U/µl *PfuUltra* HF DNA polymerase). The PCR program consisted of initial denaturation at 95°C for 5 min, followed by 25 cycles of denaturation at 95°C for 30 s, annealing at 54°C for 1 m 30 s, and extension at 68°C for 10 m. The mutation was confirmed by automated sequencing with the *RmalE* primer 5'GTAACGCCAGGGTTTCC 3' at the 'Plate-forme d'analyses' (PAB; Université Laval, Quebec).

2.2 Production and purification of STb. Wildtype and variant STb enterotoxin were produced as previously described [20]. *E. coli* HB101 strains harboring pMal-STb, a plasmid encoding wildtype or variant STb proteins fused to maltose-binding protein, were grown in Luria broth containing 50 µg of ampicillin/ml until the optical

density at 600 nm (OD_{600}) reached 0.5. Then, 0.3 mM IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside) was added to induce the synthesis of the fusion protein. Three hours after induction, cells were harvested by centrifugation at $4,000 \times g$ for 10 min at 4°C. The pellet was gently resuspended in 500 ml of 30 mM Tris-HCl (pH 8.0) containing 20% (wt/vol) sucrose and 1 mM EDTA. After centrifugation at $8,000 \times g$ for 10 min at 4°C, the cells were resuspended in 500 ml of 5 mM $MgSO_4$ and incubated at 4°C for 10 min. After centrifugation at $8,000 \times g$ for 10 min at 4°C, supernatants containing the fusion proteins were first purified using amylose-affinity chromatography (New England Biolabs, Pickering, On, Canada). The eluted proteins were dialyzed against Xa buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM $CaCl_2$) and then cleaved with protease factor Xa (Roche, Mississauga, ON, Canada). Using an Akta Purifier10 system (GE Healthcare, Mississauga, On, Canada), the cleaved material was loaded onto a C_8 reversed-phase column (Brownlee Aquapore RP-300; PerkinElmer, Shelton, CT, USA) and eluted with a linear gradient of acetonitrile (5 to 100%) in a water solution containing 0.1% trifluoroacetic acid. Wildtype and variant STb preparations were quantified at 214 nm using aprotinin as the reference standard. The purified preparations were lyophilized and kept at -20°C until use.

2.3 Circular dichroism analysis. Circular dichroism (CD) measurements were carried out in a Jasco J-818 spectropolarimeter (Fasco, Easton, MD, USA). CD spectra were acquired using a 0.1 cm pathlength quartz cuvette. Concentrations of

wildtype and variant STb were adjusted to 0.15 mg/ml in distilled water. Spectra are the results of four computer-averaged scans with baseline subtracted, and smoothed.

2.4 Surface plasmon resonance analysis. Binding between purified STb (wildtype and variant; ~5200 Da) and sulfatide (SFT) (~794 kDa; Sigma, Oakville, ON) was examined using a BIACORE 3000 system (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, SE). Experiments were performed on research-grade HPA sensor chips (Biacore) at 25°C using filtered (0.2 μ m) and degassed HBS (10 mM Hepes pH 7.4, 150 mM NaCl). A SFT stock solution (5 mg in 2.5 mL = 2.0 mg/mL) was prepared in HPLC-grade methanol (Fisher, Ottawa, ON) and stored at 4°C. Protein-grade n-octyl- β -D-glucopyranoside (nOG) was from Anatrace (Maumee, OH); fatty acid-free bovine serum albumin (BSA) was from Millipore (Etobicoke, ON); all other chemicals were reagent grade quality.

Immobilized SFT surfaces were prepared as previously described (Goncalves *et al.*, 2008), but with modifications. Briefly, flowcells were initially cleaned (5 μ L/min x 25 μ L x 2) with nOG (10% stock x 1/9 dilution in water = ~40 mM). Methanol-free, clarified SFT (2.5 mM stock x 1/3 dilution in buffer = ~0.83 mM) was captured until a final density of ~900 RU was obtained (typically 5 μ L/min x 125 μ L). Surfaces were washed with NaOH (5 mM in buffer; 50 μ L/min x 50 μ L) before blocking with BSA (0.1 mg/mL in buffer; 50 μ L/min x 250 μ L). Surfaces were finally stabilized with NaCl (1 M in buffer; 50 μ L/min x 25 μ L x 3) before use. Corresponding reference surfaces were prepared in the absence of SFT addition.

To compare binding affinities, wildtype and variant STb (0 – 10 μ M; 2-fold dilution series) were titrated over immobilized SFT and reference surfaces in-tandem (50 μ L/min x 2 min association + 4 min dissociation). Surfaces were regenerated between sample injections at 50 μ L/min using two 30 s pulses of solution I (1 M imidazole pH 9.5) and solution II (1 M guanidine pH 2.0), followed by 'EXTRACLEAN' and 'RINSE' procedures. Double-referenced data (Myszka, 1999) is representative of duplicate injections acquired from three independent trials. To estimate apparent equilibrium dissociation constants (K_D), binding responses were averaged, plotted as a function of STb concentration (C), and then subjected to non-linear regression analysis (BIAevaluation v4.1 software).

2.5 Cell culture. IPEC-J2 cells derived from porcine jejunal epithelial cells were kindly supplied by Dr A. Blikslager (North Carolina State University, Raleigh, USA). The cells were grown and maintained in 50% Dulbecco's Modified Eagle Medium and 50% Nutrient Mixture F12 (Ham) (DMEM-F12) supplemented with 5% fetal bovine serum and penicillin/streptomycin (1%). Cells were maintained by serial passages in 75 cm² flasks at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere. Medium and supplements for cell culture were from Invitrogen Life Technologies (Burlington, ON, Canada).

2.6 Flow cytometry analysis. For the IPEC-J2 internalization assays, wildtype and variant STb proteins were labelled with the EZ-label TMFITC kit (Pierce Rockford, IL, USA). Cells were grown for 48 hours to reach 60% confluence and detached using

0.05% trypsin-EDTA solution (Invitrogen Life Technologies, Burlington, ON, Canada), neutralized by complete media before distribution at a density of 500 000 cells per tube. After centrifugation, cells were resuspended in PBS and 0.5 µg/ml STb-FITC was added. The mixture was incubated for 30 minutes at 4°C or 37°C, followed by washing with cold PBS. FACS measurements were performed on at least 10 000 cells using Cellquest software on a FACSCalibur (BD Biosciences, Mississauga, ON, Canada).

Results and discussion

Secondary structure of wildtype and variant STb

Since the presence of both disulfide bonds that stabilize STb secondary structure are crucial for its toxic activity, we compared the purified wildtype and variant proteins. Figure 1 shows that far UV CD spectra of wildtype and variant STb at 20°C are very similar, both corresponding principally to α -helices. Secondary structures predicted by Dichroweb (dichroweb.cryst.bbk.ac.uk) indicated that wildtype STb consists of 76% α -helices, 2% β sheet, and 22% random coils, compared to variant STb with 70% α -helices, 4% β sheet, and 25% random coils. In a study performed by Sukumar *et al.*, reduction of the toxin's disulfide bonds was shown to dramatically alter its secondary structure [3]. In fact, Sukumar *et al.* estimated that reduced STb comprises 20% α -helices, 29% β sheet, and 51% random coils. It thus appears that the variant has formed disulfide bonds and that its secondary structure is principally composed of α -helices as wildtype STb.

Since the wildtype and variant toxins exhibited similar far UV CD spectra, the thermal stability of both proteins was then evaluated following denaturation and renaturation (Fig. 1; D-E). While the secondary structure of both wildtype and variant STb are affected by heat, no dramatic denaturation of either protein was observed. Given that disulfide bonds play a central role in maintaining STb's secondary structure, data from the renaturation experiments clearly indicate that the wildtype and variant proteins were properly refolded following heat treatment.

Receptor binding

STb mutagenesis studies have demonstrated that binding to sulfatide receptor positively correlates with STb toxicity [17]. Comparative SPR binding analyses (Figure 2) demonstrated that variant STb (His¹² to Asn) exhibits a reduced affinity for immobilized sulfatide ($K_D > 1.5 \mu\text{M}$) compared to wildtype ($K_D \sim 1.5 \mu\text{M}$). Despite dose-dependent differences in the observed binding responses, both variant and wildtype STb exhibited similar association and dissociation kinetics.

Cellular internalization

It has been demonstrated that following STb attachment, the toxin is able to be internalized into rat intestinal epithelial cells [13]. Moreover, another study demonstrated that following its interaction with epithelial cells, approximately half of the radiolabelled toxin (STb-I¹²⁵) was found associated with the plasma membrane and half inside the cytoplasm in epithelial cell lines HT29 and T84 [12]. We thus compared the interaction of wildtype and variant STb with IPEC-J2 cells derived from porcine jejunal epithelial cells. This cell line provides a good cellular model for the study of STb *in vitro* [21]. These cells were incubated with FITC-labelled wildtype or variant STb and then analysed at 37 °C by FACS, as well as 4 °C (negative control) suspending cellular pathways (Fig. 3). The variant internalized 49.2% of cells, whereas the wildtype internalized 41.2 % of IPEC-J2 cells. Thus, the variant was able to internalize in a slightly higher percentage of cells compared to wildtype.

As mentioned previously, an assay was conducted to determine the fate of STb following its attachment on epithelial cells [13]. This study determined, using anti-

STb labeled with gold particles, that the toxin is internalized into the cells. Moreover, a mutant in the hydrophobic α -helix was unable to do so. This mutant was also shown to be less toxic [17]. Based on these results, we can presume that a higher internalization from the variant results in a higher toxicity compared to the wildtype toxin.

Fujii and al. also study mutants with substitutions at arginine and histidine residues; H₁₂V, R₁₄L, and R₂₉I. A twofold reduction in the toxin's activity was recorded, but since the intestinal loop assay is not very precise, the authors concluded that this reduction was not significant [19]. Compared to previous STb mutants (e.g. F37K, I41S, M42S) that have exhibited reduced toxicity with reduced sulfatide affinity, the current H₁₂N variant was characterized by increased cellular internalization despite slightly reduced sulfatide affinity. Notably, some of the previously characterized STb mutants (e.g. D30A) have exhibited higher sulfatide binding affinities without significant increases in toxicity [17]. In these cases, the authors suggested that binding associations between sulfatide and the mutants was so strong that limited receptor-toxin disassociation resulted in decreased toxicity. In our case, however, the SPR analyses indicated that there were no significant differences in the dissociation kinetics between wildtype and variant STb. While *in vitro* binding assays (eg. I¹²⁵-RIA, SPR) examine STb-sulfatide interactions in isolation, more physiologically-relevant assays such as cellular internalization perform in this study may involve other factors/pathways that ultimately impact on final STb toxicity.

Conclusion

Altogether, these results suggest that both the variant and the wild-type toxin are biochemically and structurally similar. The fact that the variant is highly present in strains from Quebec does not appear as a consequence of a beneficial mutation, as increased toxicity. It is more likely to be due to the fact that the variant appears to be present on a pathogenicity island [22], and that this last virulence factor is responsible for the development of enteric diseases in swine.

Acknowledgements

This work was supported by grant to J.D. Dubreuil from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada, by the Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies. C. Taillon received a grant from the Centre de Recherche en Infectiologie Porcine (CRIP). We thank Marie-Astrid Albert for help with the internalization assay and flow cytometry analysis. The SPR Facility at Sheldon Biotechnology Centre is supported by a Research Resource Grant from the Canadian Institutes of Health Research.

References

- [1] B. Nagy, P.Z. Fekete, Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in farm animals, *Vet Res* 30 (1999) 259-284.
- [2] J.D. Dubreuil, *Escherichia coli* STb enterotoxin, *Microbiology* (Reading, England) 143 (Pt 6) (1997) 1783-1795.
- [3] M. Sukumar, J. Rizo, M. Wall, L.A. Dreyfus, Y.M. Kupersztoch, L.M. Gierasch, The structure of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin b by nuclear magnetic resonance and circular dichroism, *Protein Sci* 4 (1995) 1718-1729.
- [4] V. Labrie, J. Harel, J.D. Dubreuil, Oligomerization of *Escherichia coli* enterotoxin b through its C-terminal hydrophobic alpha-helix, *Biochim Biophys Acta* 1535 (2001) 128-133.
- [5] E. Rousset, J. Harel, J.D. Dubreuil, Sulfatide from the pig jejunum brush border epithelial cell surface is involved in binding of *Escherichia coli* enterotoxin b, *Infect Immun* 66 (1998) 5650-5658.
- [6] H.E. Beausoleil, J.D. Dubreuil, In vitro binding characteristics and affinity for sulfatide of *Escherichia coli* STb enterotoxin, *Recept & channels* 7 (2001) 401-411.
- [7] B.A. Harville, L.A. Dreyfus, Involvement of 5-hydroxytryptamine and prostaglandin E2 in the intestinal secretory action of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin B, *Infect Immun* 63 (1995) 745-750.
- [8] J.W. Peterson, S.C. Whipp, Comparison of the mechanisms of action of cholera toxin and the heat-stable enterotoxins of *Escherichia coli*, *Infect Immun* 63 (1995) 1452-1461.
- [9] Y. Fujii, Y. Kondo, K. Okamoto, Involvement of prostaglandin E2 synthesis in the intestinal secretory action of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II, *FEMS Microbiol Lett* 130 (1995) 259-265.
- [10] L.A. Dreyfus, B. Harville, D.E. Howard, R. Shaban, D.M. Beatty, S.J. Morris, Calcium influx mediated by the *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin B (STB), *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (1993) 3202-3206.
- [11] C. Goncalves, V. Vachon, J.L. Schwartz, J.D. Dubreuil, The *Escherichia coli* enterotoxin STb permeabilizes piglet jejunal brush border membrane vesicles, *Infect Immun* 75 (2007) 2208-2213.
- [12] K.L. Chao, L.A. Dreyfus, Interaction of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin B with cultured human intestinal epithelial cells, *Infect Immun* 65 (1997) 3209-3217.
- [13] V. Labrie, J. Harel, J.D. Dubreuil, *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin b (STb) in vivo internalization within rat intestinal epithelial cells, *Vet Res* 33 (2002) 223-228.
- [14] C. Goncalves, J.D. Dubreuil, Effect of *Escherichia coli* STb toxin on NIH-3T3 cells, *FEMS Immunol Med Microbiol* 55 (2009) 432-441.
- [15] C. Taillon, E. Nadeau, M. Mourez, J.D. Dubreuil, Heterogeneity of *Escherichia coli* STb enterotoxin isolated from diseased pigs, *J Med Microbiol* 57 (2008) 887-890.

- [16] J.P. Segrest, H. De Loof, J.G. Dohlman, C.G. Brouillette, G.M. Anantharamaiah, Amphipathic helix motif: classes and properties, *Proteins* 8 (1990) 103-117.
- [17] V. Labrie, H.E. Beausoleil, J. Harel, J.D. Dubreuil, Binding to sulfatide and enterotoxicity of various *Escherichia coli* STb mutants, *Microbiology* (Reading, England) 147 (2001) 3141-3148.
- [18] L.A. Dreyfus, R.G. Urban, S.C. Whipp, C. Slaughter, K. Tachias, Y.M. Kupersztoch, Purification of the STB enterotoxin of *Escherichia coli* and the role of selected amino acids on its secretion, stability and toxicity, *Mol Microbiol* 6 (1992) 2397-2406.
- [19] Y. Fujii, Y. Okamuro, S. Hitotsubashi, A. Saito, N. Akashi, K. Okamoto, Effect of alterations of basic amino acid residues of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II on enterotoxicity, *Infect Immun* 62 (1994) 2295-2301.
- [20] M. Bosse, C.E. Handl, L.A. Lortie, J. Harel, J.D. Dubreuil, Fusion of the genes encoding *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin b (STb) and the maltose-binding protein to obtain mature STb enterotoxin, *Journal Gen Microbiol* 139 (1993) 631-638.
- [21] C. Goncalves, F. Berthiaume, M. Mourez, J.D. Dubreuil, *Escherichia coli* STb toxin binding to sulfatide and its inhibition by carragenan, *FEMS Microbiol Lett* 281 (2008) 30-35.
- [22] P.Z. Fekete, G. Schneider, F. Olasz, G. Blum-Oehler, J.H. Hacker, B. Nagy, Detection of a plasmid-encoded pathogenicity island in F18+ enterotoxigenic and verotoxigenic *Escherichia coli* from weaned pigs, *Int J Med Microbiol* 293 (2003) 287-298.

Legends

Figure 1: Structural characterization of purified STb toxins by CD. Comparison of the far UV CD spectra for the wildtype (violet) and variant (green) STb at 20°C (A). For thermal denaturation, far UV spectra at temperature from 20°C to 80°C with 5°C increment are shown for wildtype (B) and variant (C). For thermal renaturation, far UV CD spectra at temperatures from 80°C to 20°C with 5°C decrement are shown for wildtype (D) and variant (E).

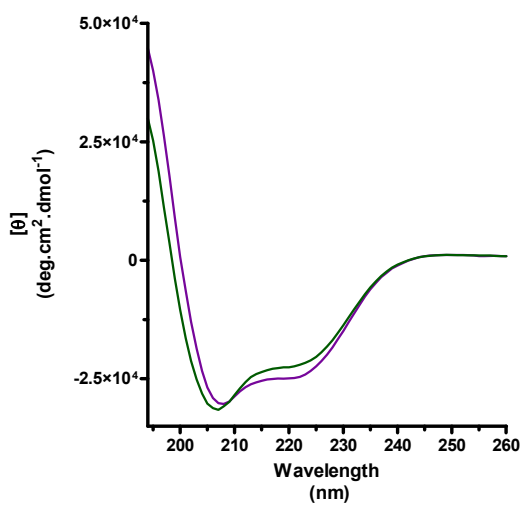
Figure 2: Label-free, real-time binding of STb toxins to SFT receptor by SPR. Wildtype (A) and variant (B) STb (0 – 10 µM; 2-fold dilution series) were titrated over immobilized SFT (~700 RU) at 50 µL/min (2 min association + 4 min dissociation). Highlighted titration series are representative of three independent trials.

Figure 3: Internalization of STb toxins in IPEC-J2 cells. Values are presented as mean +/- SEM of fluorescence positive cells percentages at 37°C and 4°C. At least 4 independent experiments were performed. Statistical analyses were performed using a Student's t-test; $p < 0.05$ was considered significant.

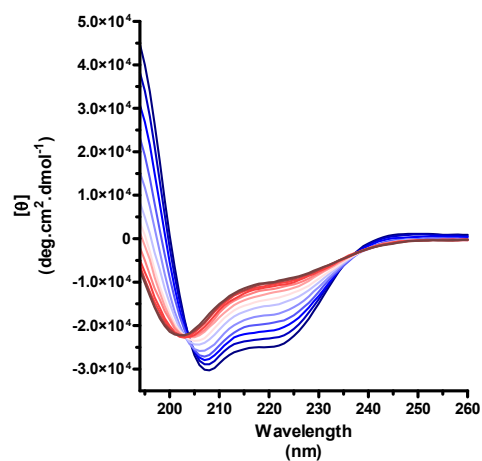
Figures

Figure 1:

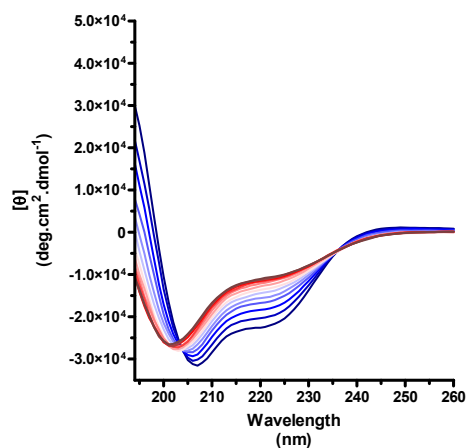
A-



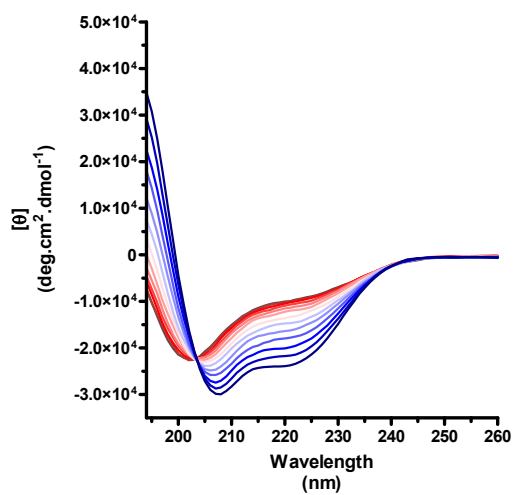
B-



C-



D-



E-

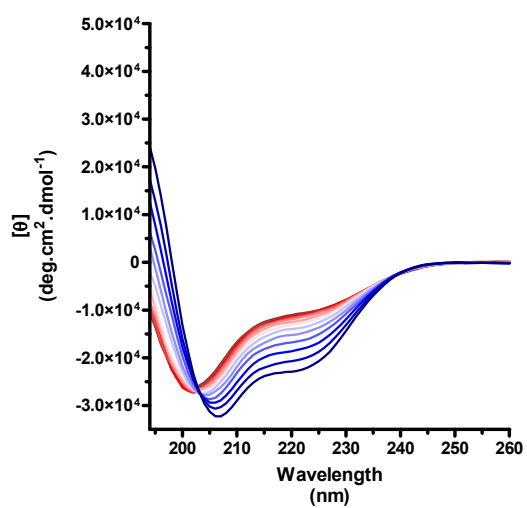


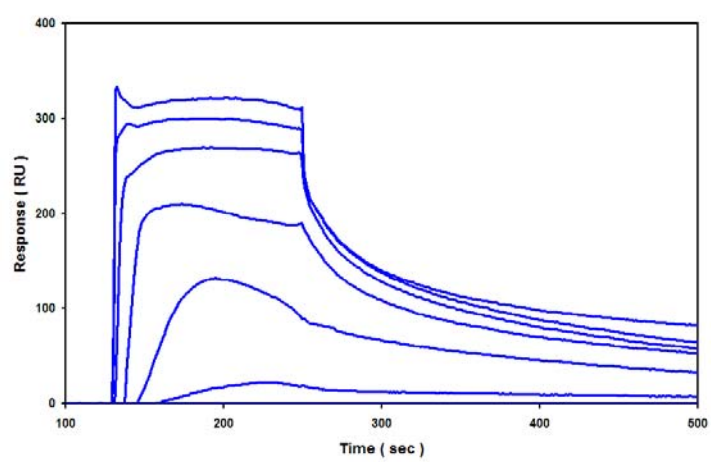
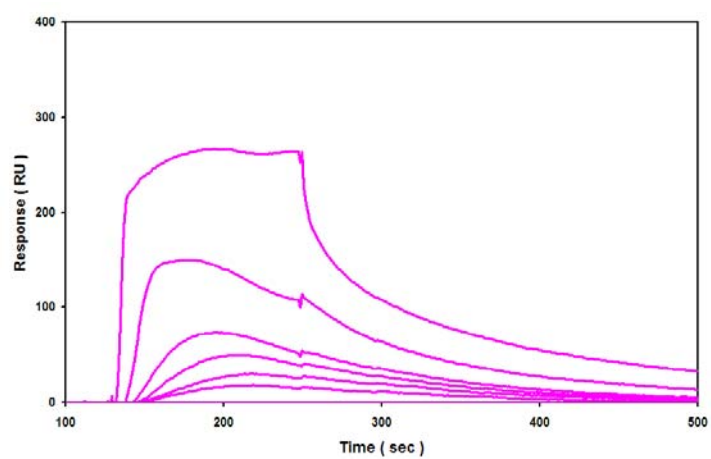
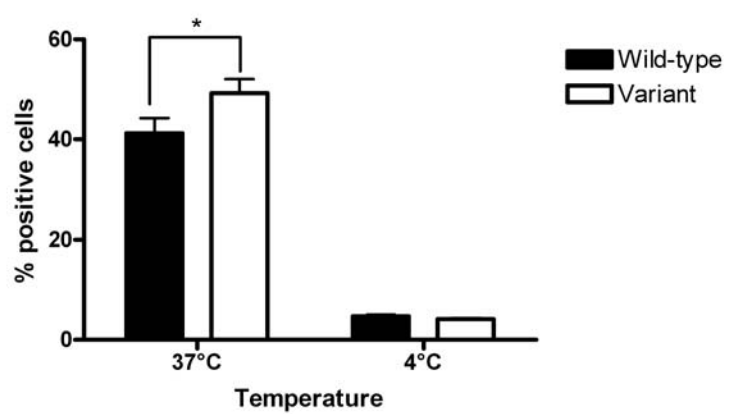
Figure 2:**A-****B-**

Figure 3:



DISCUSSION

Discussion

Présence d'un variant de la toxine STb dans les souches d'*Escherichia coli* d'origine porcine au Québec

Pour déterminer la présence et la fréquence de variant(s) de la toxine, une collection de 100 souches ETEC, isolées de porcs malades au Québec sélectionnées aléatoirement de 1980 à 2007 inclusivement, a été analysée. Cette étude a révélé la présence d'un variant portant la variation His₁₂→Asn chez environ le quart des souches. Aucun autre variant n'a été observé dans la population analysée. Cette mutation est localisée dans l'hélice- α hydrophile de la toxine. Puisque la chaîne latérale de l'histidine en position 12 est dirigée vers le solvant, cet acide aminé pourrait être impliqué dans la reconnaissance du récepteur, et donc dans la toxicité (Sukumar *et al.*, 1995). Lors d'une étude précédente, le groupe de Fekete a révélé deux mutations ponctuelles aux acides aminés His₁₂→Asn et Lys₂₃→Ile chez la souche 2173 (Fekete *et al.*, 2003). Par contre, le séquençage de la souche 2173 dans notre laboratoire a révélé plutôt une seule mutation, identique à celle trouvée dans la population d'ETEC du Québec. Ce variant semble donc avoir une vaste étendue étant donné sa présence dans presque 25% des souches du Québec.

Association du variant avec les facteurs de virulence et des virotypes ETEC

L'association du variant, décrit précédemment, avec certains facteurs de virulence ETEC a été étudiée. Il apparaît que le variant est associé avec le gène STa puisque les 23 souches qui produisaient le variant STb possédaient également le gène codant pour STa. Pour ce qui est des autres facteurs de virulence chez les ETEC, mis à part la toxine Stx2 et le fimbriae F18 présents dans environ 20% des souches possédant le variant, aucun autre facteur ne semble avoir une très forte association avec ce dernier. Les souches possédant la shiga toxine ainsi que d'autres entérotoxines sont responsables de la maladie de l'œdème et/ou la diarrhée.

Le variant est associé au virotype STb :STa ne produisant aucun fimbriae porcin testé, soit 13 des 23 souches ayant ce virotype. Bien que ces souches ne soient pas bien caractérisées, elles pourraient être associées à la diarrhée chez le porc puisque ce type de souche a déjà été isolé de porcs malades (J. M. Fairbrother, communication personnelle). Le variant est distribué à travers différents virotypes, sauf ceux possédant le fimbriae F4. D'ailleurs, le fimbriae F4 ainsi que les entérotoxines STb et LT, associées au sérotype O149, sont majoritairement impliqués dans la diarrhée post sevrage, dite classique. Ceci dit, le variant ne semble pas associé à ce type de diarrhée puisqu'aucune souche possédant le variant ne possède les gènes associés à la diarrhée post sevrage classique.

De plus, toutes les souches codant pour le variant STb possédaient également le gène de résistance à la tétracycline. Le groupe de Fekete a également révélé la présence du gène de résistance à la tétracycline dans la souche 2173 (Fekete *et al.*, 2003). Plus précisément, STb, STa et le gène de résistance à la tétracycline sont localisés sur le plasmide pTC isolé de cette souche. La souche 2173 porte plusieurs autres plasmides dont un sur lequel est codé le fimbriae F18. Les résultats de séquençage des régions adjacentes en amont et en aval de *estB* ne correspondaient pas avec le Tn₄₅₂₁, décrit comme étant un transposon codant pour le gène de la toxine (Fekete *et al.*, 2003; Hu and Lee, 1988; Hu *et al.*, 1987). Ces derniers ont ensuite étudié l'étendue du 'Toxin Specific Locus' (TSL), où se trouvent les toxines STa et STb, en utilisant des amorces correspondantes à ces régions adjacentes, qui de ce fait correspond aux régions adjacentes associées à *estB* variant. Ces résultats ont démontré que la majorité des souches F18⁺ testées possédaient ces régions adjacentes, tandis que le Tn₄₅₂₁ était présent dans près de la moitié des souches F4⁺. De plus, les auteurs ont démontré que ce TSL pouvait se transposer dans un autre plasmide par un fragment de 40 kb qu'ils ont désigné PAI I₂₁₇₃. Somme toute, ces résultats sont semblables aux résultats de notre étude et nous incite à penser que le variant observé au Québec est présent sur ce TSL en association avec STa et que ce TSL se propagerait entre autre via le PAI I₂₁₇₃ et le plasmide pTC.

Effet de la mutation sur la toxine

Étude de la structure secondaire du variant

Afin de déterminer l'effet structural d'un changement d'acide aminé dans l'hélice- α hydrophile, la technique du dichroïsme circulaire a été utilisée. Les spectres du STb sauvage et STb variant ont été comparés à 20°C. Les deux spectres sont similaires, ce qui correspond à des spectres typiques observés pour des hélices- α . D'ailleurs, lorsqu'elle est analysée par le logiciel Dichroweb, (<http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk>), la toxine sauvage se compose de 76% d'hélices- α , 2% de feuillets β et 22% de régions apériodiques comparativement au variant qui se compose de 70% d'hélices- α , 4% de feuillets β et 25% de régions apériodiques. Ces résultats sont également similaires à ceux obtenus par Sukumar *et al.* (2005). De plus, ces auteurs ont déterminé le spectre de la toxine réduite, sans ponts disulfures. On peut donc affirmer que le variant a formé ses ponts disulfures puisque que la toxine réduite se compose de 20% d'hélices- α , 29% de structure β et 51% de régions apériodiques.

La stabilité thermique a également été étudiée par dichroïsme circulaire. Les deux toxines ont été soumises à une dénaturation jusqu'à 80°C et ensuite à une renaturation jusqu'à 20°C. Les deux toxines sont affectées par la chaleur, mais ne démontrent pas de courbe de dénaturation. Les deux toxines reprennent leur forme originale lorsque la température est abaissée de 80°C à 20°C. Il n'y a donc pas de différence apparente entre la toxine sauvage et le variant au niveau de la stabilité thermique.

Étude d'internalisation

Puisque l'internalisation de la toxine avait été démontrée (Chao and Dreyfus, 1997; Labrie *et al.*, 2002), on a comparé l'internalisation de la toxine sauvage et du variant dans la lignée IPEC-J2, cellules intestinales épithéliales d'origine porcine. Cette lignée est un bon modèle pour l'étude de la toxine *in vitro* (Goncalves *et al.*, 2008), l'intestin porcin étant la cible préférentielle de la toxine *in vivo*. L'incubation avec les deux toxines a été réalisée à 37°C ainsi qu'à 4°C comme témoin négatif puisque l'activité cellulaire est minimale à cette température. La toxine sauvage a été internalisée dans 41,2% des cellules, tandis que le variant a été internalisé dans 49,2% des cellules. Bien que cette différence soit statistiquement significative, l'écart entre le pourcentage de cellules ayant internalisée la forme sauvage ou variante de STb est faible (8%). Le variant, possédant un changement d'acide aminé dans l'hélice- α hydrophile, semble donc aussi capable d'être internalisé par les cellules et ce à un niveau légèrement supérieur.

L'internalisation de la toxine suite à son attachement au sulfatide a été démontrée avec un anticorps anti-STb marqué à l'or colloïdal, suivi d'une visualisation en microscopie électronique (Labrie *et al.*, 2002). Dans cette même étude, un mutant de la toxine ayant une hydrophobicité réduite par l'introduction d'une mutation dans l'hélice- α hydrophobe (I41E-M42R), n'était pas internalisé dans les entérocytes porcins analysés en microscopie électronique. La toxicité de ce mutant, évaluée par un test dans les segments ligaturés intestinaux de rat, et son attachement au sulfatide, évalué par la technique ELISA, ont aussi été étudiés. Ce mutant montre une toxicité diminuée de 11% par rapport à la toxine sauvage et l'attachement au récepteur le plus faible de tous les mutants testés (3% de l'attachement de la toxine sauvage), suggérant que l'hélice hydrophobe est nécessaire au phénomène d'internalisation de la toxine et que la mutation de deux acides aminés dans cette région peut fortement affecter l'internalisation et la toxicité du peptide. Si

on se base sur les différences observées avec le mutant I41E-M42R, par déduction nous pourrions conclure que l'internalisation supérieure du variant observé par rapport à la toxine sauvage, pourrait se traduire par une toxicité supérieure à la toxine sauvage.

Un aspect de nos résultats va cependant à l'encontre des observations de Chao et Dreyfus qui ont étudié le phénomène d'internalisation dans deux lignées cellulaires intestinales humaines HT29 et T84 (Chao and Dreyfus, 1997). Dans cette étude, l'internalisation est indépendante de la température, alors que nous avons observé une internalisation presque nulle à 4°C dans les cellules IPEC-J2. Cette différence pourrait notamment s'expliquer par la technique utilisée par Chao et Dreyfus qui diffère de la nôtre. Ils ont utilisé un marquage avec un radioisotope au lieu du marquage fluorescent, et leurs résultats analysés avec un compteur de rayons γ tandis que nous avons employé la technique de cytométrie en flux. De plus, les lignées cellulaires utilisées par Chao et Dreyfus sont dérivées de cellules intestinales épithéliales humaines tandis que nous avons utilisé une lignée dérivée de cellules intestinales épithéliales de porc, la cible *in vivo* de la toxine STb.

Étude de l'attachement au sulfatide

L'étude de l'attachement de plusieurs mutants ponctuels au sulfatide a démontré un lien entre l'attachement et la toxicité de la toxine (Labrie *et al.*, 2001a). Les mutations sont présentes sur la boucle riche en glycine et sur l'hélice- α hydrophobe, par contre aucune n'altère l'hélice- α hydrophile. L'asparagine est un acide aminé polaire non chargé et hydrophile, tandis que l'histidine est chargée positivement. Cette différence de charge pourrait donc modifier l'interaction de la toxine envers le sulfatide. Nous avons donc évalué l'attachement du variant au sulfatide par résonance plasmonique de surface (SPR). Ceci a permis de mettre en évidence que la liaison toxine-sulfatide est réduite pour le variant par rapport à la toxine sauvage. Ces résultats vont à l'opposé de ce que nous avons obtenu pour le test d'internalisation.

Les mutants étudiés, mentionnés plus haut, montrent un attachement diminué pour la plupart, ainsi qu'une toxicité diminuée (Labrie *et al.*, 2001a). Par contre, le variant montre une internalisation légèrement supérieure au sauvage, mais une liaison avec le sulfatide plus faible. D'autres mutants étudiés précédemment démontrent un attachement supérieur (jusqu'à 153 et même 212% de l'attachement du sauvage), mais une diminution dans la toxicité. Les auteurs ont alors suggéré que la liaison était si forte avec le récepteur que la toxine n'est pas capable de se dissocier. Il en résulterait donc une interférence avec la cascade d'évènement menant à la diarrhée. Toutefois dans notre cas, les analyses par SPR montrent qu'il n'y a aucune différence significative dans la cinétique de dissociation entre le variant et la toxine sauvage.

La toxine STb est aussi capable de se lier à d'autres gangliosides que le sulfatide (Beausoleil and Dubreuil, 2001; Rousset *et al.*, 1998). Le variant pourrait présenter une meilleure affinité envers ces autres gangliosides présents à la surface des cellules épithéliales, et ainsi serait plus internalisé. Puisque la technique *in vitro* que nous avons utilisée étudie l'interaction entre le sulfatide et la toxine en isolation, des techniques *in vivo* plus approprié physiologiquement pourraient impliquer d'autres facteurs important dans le mécanisme d'action de la toxine. Il est aussi possible que l'internalisation ne soit pas directement lié à la toxicité, malgré ce que semblait démontrer d'autres études précédentes (Labrie *et al.*, 2002) (Goncalves *et al.*, 2007). L'étape cruciale dans le mécanisme d'action de la toxine menant à la toxicité serait alors remise en question. Il serait donc important d'évaluer la toxicité dans un modèle animal afin de vérifier ces hypothèses.

En conclusion, il s'avère que ce variant est biologiquement différent de la toxine sauvage, bien que cette différence soit plutôt faible. Par contre, cette différence ne semble pas être dû à une modification de la structure secondaire puisque les spectres du variant et de la toxine sauvage sont similaires. D'ailleurs, une étude démontre que des mutants dans la boucle riche en glycine, moins toxiques que la toxine sauvage, ont des spectres similaires, ce qui indique que la réduction de toxicité

n'est pas attribuable à un changement de conformation de la toxine (Fujii *et al.*, 1994). Dans une population de bactéries en croissance, plusieurs mutations peuvent survenir, et plusieurs de celles-ci non favorables à la bactérie seront donc éliminées de la population. De leurs côtés, les mutations avantageuses permettant de s'adapter aux conditions nouvelles de l'environnement et sont ainsi conservées et se propagent dans l'environnement (Drake, 1969; Imhof and Schlotterer, 2001). Cependant dans le cas qui nous intéresse, la fréquence du variant, élevée dans la population d'ETEC du Québec, ne semble pas être liée à sa toxicité plus élevée. Puisqu'on l'a toujours retrouvé associé avec la toxine STa dans la population qu'on a étudié, il semblerait que le variant se multiplierait via l'îlot de pathogénicité, le PAI I₂₁₇₃, décrit par le groupe de Fekete (Fekete *et al.*, 2003). De plus, il semble se multiplier également via le plasmide pTC puisque toutes les souches possédant le variant possèdent également le gène codant pour la résistance à la tétracycline. Ce plasmide est d'ailleurs considéré comme étant un facteur de virulence majeur dans la diarrhée porcine (Nagy and Fekete, 2005).

Conclusion

Nos résultats démontrent la présence d'un variant de la toxine STb dans la population de souches ETEC du Québec. Un seul variant a été révélé et ce dernier est répandu dans près du quart des souches testées. Un seul acide aminé le différencie de la souche sauvage.

Le variant démontre une structure secondaire quasi identique à la toxine sauvage, et la stabilité de cette structure semble aussi similaire. Au niveau de l'attachement avec le récepteur de la toxine, le variant a une affinité réduite comparativement à la toxine sauvage. Par contre, au niveau de l'internalisation à l'intérieur des cellules IPEC-J2, le variant démontre une internalisation légèrement plus élevée que la toxine sauvage. Ces résultats sont donc contradictoires si on prend en considération les résultats obtenus dans des études passées.

Malgré tout, les différences d'internalisation et d'attachement entre la toxine sauvage et le variant restent faibles. Ce variant semble donc se propager dans l'environnement plus via un élément génétique, vraisemblablement le même découvert par le groupe de Fekete puisque le variant de notre étude est aussi associé à la toxine STa tout comme dans le PAI I₂₁₇₃, qu'à une altération de sa fonction.

Perspectives

Présence du variant dans la population d'ETEC

Afin de déterminer quand est survenu cette mutation ponctuelle, un séquençage de souches datant d'avant 1980 pourrait être effectué. De même, il se pourrait que d'autres mutations ponctuelles aient eu lieu dans le passé et que celles-ci aient été éliminées dans le temps.

Détermination de la présence du PAI I₂₁₇₃ dans les souches où le variant est présent

Une des hypothèses de notre étude est que le variant s'est propagé via PAI I₂₁₇₃. Pour confirmer cette hypothèse, il serait intéressant d'identifier les séquences en amont et en aval du gène codant pour le STb variant afin de révéler ou non des séquences du PAI I₂₁₇₃. Pour cela plusieurs techniques peuvent être utilisées telles des techniques de PCR et parmi celles-ci la PCR unidirectionnelle avec séquençage direct.

Détermination de la toxicité du variant

Puisque nos études d'attachement au sulfatide et d'internalisation sont contradictoires, le test ultime pour déterminer la toxicité du variant serait d'effectuer des segments ligaturés chez le rat, un modèle reproduisant la diarrhée observée chez le porc (Labrie *et al.*, 2001a). Cette technique pourrait déterminer la capacité du variant à induire la sécrétion de fluide dans l'intestin. De plus, les résultats du test de toxicité par segment ligaturés chez le rat pourraient contribuer à éclaircir le mécanisme d'action de la toxine.

Attachement du variant à d'autres gangliosides

Une autre hypothèse est que l'internalisation supérieure observée pour le variant serait due à une affinité supérieure pour d'autres gangliosides présents sur les cellules épithéliales porcines. On pourrait donc déterminer les constantes de dissociation pour les divers gangliosides déjà identifiés comme ayant une certaine affinité avec la toxine STb (Beausoleil and Dubreuil, 2001) par résonance plasmonique de surface. Suite à cela, il serait intéressant d'effectuer le test d'internalisation en bloquant l'interaction entre le variant et les différents gangliosides en utilisant des anticorps contre ces derniers.

Capacité du variant à former des oligomères

Il a été démontré que la toxine est capable de former des oligomères (Labrie *et al.*, 2001b). Certains des mutants étudiés dans une étude précédente ont perdu la capacité à former des oligomères, et la toxicité de ces derniers étaient également diminuée. Il serait donc intéressant d'étudier l'interaction protéine-protéine avec le variant. Ces résultats pourraient nous donner plus d'indices sur le mécanisme d'action de la toxine.

BIBLIOGRAPHIE

- Akashi N., Hitotsubashi S., Yamanaka H., Fujii Y., Tsuji T., Miyama A., Joya J. E. and Okamoto K. (1993) Production of heat-stable enterotoxin II by chicken clinical isolates of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* **109**, 311-5.
- Arriaga Y. L., Harville B. A. and Dreyfus L. A. (1995) Contribution of individual disulfide bonds to biological action of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin B. *Infect Immun* **63**, 4715-20.
- Batisson I. and der Vartanian M. (2000) Extracellular DsbA-insensitive folding of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin STa in vitro. *J Biol Chem* **275**, 10582-9.
- Batisson I., Guimond M. P., Girard F., An H., Zhu C., Oswald E., Fairbrother J. M., Jacques M. and Harel J. (2003) Characterization of the novel factor paa involved in the early steps of the adhesion mechanism of attaching and effacing *Escherichia coli*. *Infect Immun* **71**, 4516-25.
- Bauer A. W., Kirby W. M., Sherris J. C. and Turck M. (1966) Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol* **45**, 493-6.
- Beausoleil H. E. and Dubreuil J. D. (2001) In vitro binding characteristics and affinity for sulfatide of *Escherichia coli* STb enterotoxin. *Receptors Channels* **7**, 401-11.
- Beausoleil H. E., Labrie V. and Dubreuil J. D. (2002) Trypan blue uptake by chinese hamster ovary cultured epithelial cells: a cellular model to study *Escherichia coli* STb enterotoxin. *Toxicon* **40**, 185-91.
- Berberov E. M., Zhou Y., Francis D. H., Scott M. A., Kachman S. D. and Moxley R. A. (2004) Relative importance of heat-labile enterotoxin in the causation of severe diarrheal disease in the gnotobiotic piglet model by a strain of enterotoxigenic *Escherichia coli* that produces multiple enterotoxins. *Infect Immun* **72**, 3914-24.
- Beubler E., Bukhave K. and Rask-Madsen J. (1986) Significance of calcium for the prostaglandin E2-mediated secretory response to 5-hydroxytryptamine in the small intestine of the rat in vivo. *Gastroenterology* **90**, 1972-7.
- Beutin L. (1999) *Escherichia coli* as a pathogen in dogs and cats. *Vet Res* **30**, 285-98.
- Bolton J. E. and Field M. (1977) Ca ionophore-stimulated ion secretion in rabbit ileal mucosa: relation to actions of cyclic 3',5'-AMP and carbamylcholine. *J Membr Biol* **35**, 159-73.
- Bosse M., Handl C. E., Lortie L. A., Harel J. and Dubreuil J. D. (1993) Fusion of the genes encoding *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin b (STb) and the maltose-binding protein to obtain mature STb enterotoxin. *J Gen Microbiol* **139**, 631-8.
- Burgess M. N., Bywater R. J., Cowley C. M., Mullan N. A. and Newsome P. M. (1978) Biological evaluation of a methanol-soluble, heat-stable *Escherichia coli* enterotoxin in infant mice, pigs, rabbits, and calves. *Infect Immun* **21**, 526-31.
- Busque P., Letellier A., Harel J. and Dubreuil J. D. (1995) Production of *Escherichia coli* STb enterotoxin is subject to catabolite repression. *Microbiology* **141** (Pt 7), 1621-7.

- Chao K. L. and Dreyfus L. A. (1997) Interaction of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin B with cultured human intestinal epithelial cells. *Infect Immun* **65**, 3209-17.
- Chao K. L. and Dreyfus L. A. (1999) Interaction of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin B with rat intestinal epithelial cells and membrane lipids. *FEMS Microbiol Lett* **172**, 91-7.
- Chapman T. A., Wu X. Y., Barchia I., Bettelheim K. A., Driesen S., Trott D., Wilson M. and Chin J. J. (2006) Comparison of virulence gene profiles of *Escherichia coli* strains isolated from healthy and diarrheic swine. *Appl Environ Microbiol* **72**, 4782-95.
- Chen H. D. and Frankel G. (2005) Enteropathogenic *Escherichia coli*: unravelling pathogenesis. *FEMS Microbiol Rev* **29**, 83-98.
- Choi C., Kwon D. and Chae C. (2001) Prevalence of the enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 gene and its relationship with fimbrial and enterotoxin genes in *E. coli* isolated from diarrheic piglets. *J Vet Diagn Invest* **13**, 26-9.
- Donnenberg M. S. and Whittam T. S. (2001) Pathogenesis and evolution of virulence in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J Clin Invest* **107**, 539-48.
- Donowitz M., Asarkof N. and Pike G. (1980) Calcium dependence of serotonin-induced changes in rabbit ileal electrolyte transport. *J Clin Invest* **66**, 341-52.
- Donowitz M., Charney A. N. and Heffernan J. M. (1977) Effect of serotonin treatment on intestinal transport in the rabbit. *Am J Physiol* **232**, E85-94.
- Drake J. W. (1969) Comparative rates of spontaneous mutation. *Nature* **221**, 1132.
- Dreyfus L. A., Harville B., Howard D. E., Shaban R., Beatty D. M. and Morris S. J. (1993) Calcium influx mediated by the *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin B (STB). *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 3202-6.
- Dreyfus L. A., Urban R. G., Whipp S. C., Slaughter C., Tachias K. and Kupersztoch Y. M. (1992) Purification of the STB enterotoxin of *Escherichia coli* and the role of selected amino acids on its secretion, stability and toxicity. *Mol Microbiol* **6**, 2397-406.
- Dubreuil J. D. (1997) *Escherichia coli* STb enterotoxin. *Microbiology* **143** (Pt 6), 1783-95.
- Dubreuil J. D., Letellier A. and Harel J. (1996) A recombinant *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin b (STb) fusion protein eliciting neutralizing antibodies. *FEMS Immunol Med Microbiol* **13**, 317-23.
- Echeverria P., Seriwatana J., Taylor D. N., Tirapat C. and Rowe B. (1985) *Escherichia coli* contains plasmids coding for heat-stable b, other enterotoxins, and antibiotic resistance. *Infect Immun* **48**, 843-6.
- Eklund S., Jodal M. and Lundgren O. (1985) The enteric nervous system participates in the secretory response to the heat stable enterotoxins of *Escherichia coli* in rats and cats. *Neuroscience* **14**, 673-81.
- Erickson A. K., Baker D. R., Bosworth B. T., Casey T. A., Benfield D. A. and Francis D. H. (1994) Characterization of porcine intestinal receptors for the K88ac fimbrial adhesin of *Escherichia coli* as mucin-type sialoglycoproteins. *Infect Immun* **62**, 5404-10.

- Fairbrother J. M. (1994) Characterization of *Escherichia coli* isolated from post-weaning piglets with and without diarrhea. In *13th IPVS Congress*, p. 212, Bangkok, Thailand.
- Fairbrother J. M. (2000) Trends in pathotype and antimicrobial resistance of *E. coli* isolates from weaned pigs. In *16th IPVS Congress*, p. 16-17, Melbourne, Australia.
- Fairbrother J. M., Broes A., Jacques M. and Lariviere S. (1989) Pathogenicity of *Escherichia coli* O115:K"V165" strains isolated from pigs with diarrhea. *Am J Vet Res* **50**, 1029-36.
- Fairbrother J. M., Nadeau E. and Gyles C. L. (2005) *Escherichia coli* in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies. *Anim Health Res Rev* **6**, 17-39.
- Fecteau G., Fairbrother J. M., Higgins R., Van Metre D. C., Pare J., Smith B. P., Holmberg C. A. and Jang S. (2001) Virulence factors in *Escherichia coli* isolated from the blood of bacteremic neonatal calves. *Vet Microbiol* **78**, 241-9.
- Fekete P. Z., Schneider G., Olasz F., Blum-Oehler G., Hacker J. H. and Nagy B. (2003) Detection of a plasmid-encoded pathogenicity island in F18+ enterotoxigenic and verotoxigenic *Escherichia coli* from weaned pigs. *Int J Med Microbiol* **293**, 287-98.
- Fontaine F, Pères S, Gyles CL and Fairbrother JM. (2002) Trends in O149:K91 enterotoxigenic *Escherichia coli* from pigs in Québec. In *17th IPVS Congress*, p. 70, Ames, USA.
- Foreman D. T., Martinez Y., Coombs G., Torres A. and Kupersztoch Y. M. (1995) TolC and DsbA are needed for the secretion of STB, a heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **18**, 237-45.
- Francis D. (2002) Enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in pigs and its diagnosis. *Journal of Swine Health and Production* **10**, 171-175.
- Francis D. H., Erickson A. K. and Grange P. A. (1999) K88 adhesins of enterotoxigenic *Escherichia coli* and their porcine enterocyte receptors. *Adv Exp Med Biol* **473**, 147-54.
- Friedrich A. W., Bielaszewska M., Zhang W. L., Pulz M., Kuczius T., Ammon A. and Karch H. (2002) *Escherichia coli* harboring Shiga toxin 2 gene variants: frequency and association with clinical symptoms. *J Infect Dis* **185**, 74-84.
- Fujii Y., Hayashi M., Hitotsubashi S., Fuke Y., Yamanaka H. and Okamoto K. (1991) Purification and characterization of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II. *J Bacteriol* **173**, 5516-22.
- Fujii Y., Kondo Y. and Okamoto K. (1995) Involvement of prostaglandin E2 synthesis in the intestinal secretory action of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II. *FEMS Microbiol Lett* **130**, 259-65.
- Fujii Y., Nomura T., Yamanaka H. and Okamoto K. (1997) Involvement of Ca(2+)-calmodulin-dependent protein kinase II in the intestinal secretory action of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II. *Microbiol Immunol* **41**, 633-6.
- Fujii Y., Okamoto Y., Hitotsubashi S., Saito A., Akashi N. and Okamoto K. (1994) Effect of alterations of basic amino acid residues of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II on enterotoxicity. *Infect Immun* **62**, 2295-301.

- Gerard-Vincent M., Robert V., Ball G., Bleves S., Michel G. P., Lazdunski A. and Filloux A. (2002) Identification of XcpP domains that confer functionality and specificity to the *Pseudomonas aeruginosa* type II secretion apparatus. *Mol Microbiol* **44**, 1651-65.
- Golin-Bisello F., Bradbury N. and Ameen N. (2005) STa and cGMP stimulate CFTR translocation to the surface of villus enterocytes in rat jejunum and is regulated by protein kinase G. *Am J Physiol Cell Physiol* **289**, C708-16.
- Goncalves C., Berthiaume F., Mourez M. and Dubreuil J. D. (2008) *Escherichia coli* STb toxin binding to sulfatide and its inhibition by carragenan. *FEMS Microbiol Lett* **281**, 30-5.
- Goncalves C. and Dubreuil J. D. (2009) Effect of *Escherichia coli* STb toxin on NIH-3T3 cells. *FEMS Immunol Med Microbiol* **55**, 432-41.
- Goncalves C., Vachon V., Schwartz J. L. and Dubreuil J. D. (2007) The *Escherichia coli* enterotoxin STb permeabilizes piglet jejunal brush border membrane vesicles. *Infect Immun* **75**, 2208-13.
- Grange P. A., Mouricout M. A., Lavery S. B., Francis D. H. and Erickson A. K. (2002) Evaluation of receptor binding specificity of *Escherichia coli* K88 (F4) fimbrial adhesin variants using porcine serum transferrin and glycosphingolipids as model receptors. *Infect Immun* **70**, 2336-43.
- Ha S. K., Choi C. and Chae C. (2003) Prevalence of a gene encoding adhesin involved in diffuse adherence among *Escherichia coli* isolates in pigs with postweaning diarrhea or edema disease. *J Vet Diagn Invest* **15**, 378-81.
- Hammermueller J., Kruth S., Prescott J. and Gyles C. (1995) Detection of toxin genes in *Escherichia coli* isolated from normal dogs and dogs with diarrhea. *Can J Vet Res* **59**, 265-70.
- Handl C. E. and Flock J. I. (1992) STb producing *Escherichia coli* are rarely associated with infantile diarrhoea. *J Diarrhoeal Dis Res* **10**, 37-8.
- Harel J., Lapointe H., Fallara A., Lortie L. A., Bigras-Poulin M., Lariviere S. and Fairbrother J. M. (1991) Detection of genes for fimbrial antigens and enterotoxins associated with *Escherichia coli* serogroups isolated from pigs with diarrhea. *J Clin Microbiol* **29**, 745-52.
- Harville B. A. and Dreyfus L. A. (1995) Involvement of 5-hydroxytryptamine and prostaglandin E2 in the intestinal secretory action of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin B. *Infect Immun* **63**, 745-50.
- Henderson I. R., Navarro-Garcia F., Desvaux M., Fernandez R. C. and Ala'Aldeen D. (2004) Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**, 692-744.
- Hitotsubashi S., Fujii Y., Yamanaka H. and Okamoto K. (1992) Some properties of purified *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II. *Infect Immun* **60**, 4468-74.
- Hu S. T. and Lee C. H. (1988) Characterization of the transposon carrying the STII gene of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* **214**, 490-5.
- Hu S. T., Yang M. K., Spandau D. F. and Lee C. H. (1987) Characterization of the terminal sequences flanking the transposon that carries the *Escherichia coli* enterotoxin STII gene. *Gene* **55**, 157-67.
- Imhof M. and Schlotterer C. (2001) Fitness effects of advantageous mutations in evolving *Escherichia coli* populations. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 1113-7.

- Itoh Y., Nagano I., Kunishima M. and Ezaki T. (1997) Laboratory investigation of enteroaggregative *Escherichia coli* O untypeable:H10 associated with a massive outbreak of gastrointestinal illness. *J Clin Microbiol* **35**, 2546-50.
- Jin L. Z., Marquardt R. R. and Zhao X. (2000) A strain of *Enterococcus faecium* (18C23) inhibits adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 to porcine small intestine mucus. *Appl Environ Microbiol* **66**, 4200-4.
- Johnson A. M., Kaushik R. S., Francis D. H., Fleckenstein J. M. and Hardwidge P. R. (2009) Heat-labile enterotoxin promotes *Escherichia coli* adherence to intestinal epithelial cells. *J Bacteriol* **191**, 178-86.
- Kaper J. B., Nataro J. P. and Mobley H. L. (2004) Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* **2**, 123-40.
- Kawano K., Yamada T., Yagi T. and Ito K. (1998) [Detection of enteroaggregative *Escherichia coli* from sporadic diarrhea patients]. *Kansenshogaku Zasshi* **72**, 1275-82.
- Kisloff B. and Moore E. W. (1976) Effect of serotonin on water and electrolyte transport in the in vivo rabbit small intestine. *Gastroenterology* **71**, 1033-8.
- Kobayashi N., Nishino K., Hirata T. and Yamaguchi A. (2003) Membrane topology of ABC-type macrolide antibiotic exporter MacB in *Escherichia coli*. *FEBS Lett* **546**, 241-6.
- Kobayashi N., Nishino K. and Yamaguchi A. (2001) Novel macrolide-specific ABC-type efflux transporter in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **183**, 5639-44.
- Koronakis V., Eswaran J. and Hughes C. (2004) Structure and function of TolC: the bacterial exit duct for proteins and drugs. *Annu Rev Biochem* **73**, 467-89.
- Laarmann S. and Schmidt M. A. (2003) The *Escherichia coli* AIDA autotransporter adhesin recognizes an integral membrane glycoprotein as receptor. *Microbiology* **149**, 1871-82.
- Labrie V., Beausoleil H. E., Harel J. and Dubreuil J. D. (2001a) Binding to sulfatide and enterotoxicity of various *Escherichia coli* STb mutants. *Microbiology* **147**, 3141-8.
- Labrie V., Harel J. and Dubreuil J. D. (2001b) Oligomerization of *Escherichia coli* enterotoxin b through its C-terminal hydrophobic alpha-helix. *Biochim Biophys Acta* **1535**, 128-33.
- Labrie V., Harel J. and Dubreuil J. D. (2002) *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin b (STb) in vivo internalization within rat intestinal epithelial cells. *Vet Res* **33**, 223-8.
- Lee C. H., Hu S. T., Swiatek P. J., Moseley S. L., Allen S. D. and So M. (1985) Isolation of a novel transposon which carries the *Escherichia coli* enterotoxin STII gene. *J Bacteriol* **162**, 615-20.
- Lee C. H., Moseley S. L., Moon H. W., Whipp S. C., Gyles C. L. and So M. (1983) Characterization of the gene encoding heat-stable toxin II and preliminary molecular epidemiological studies of enterotoxigenic *Escherichia coli* heat-stable toxin II producers. *Infect Immun* **42**, 264-8.
- Lopes L. M., Fabbriotti S. H., Ferreira A. J., Kato M. A., Michalski J. and Scaletsky I. C. (2005) Heterogeneity among strains of diffusely adherent *Escherichia coli* isolated in Brazil. *J Clin Microbiol* **43**, 1968-72.

- Lortie L. A., Dubreuil J. D. and Harel J. (1991) Characterization of *Escherichia coli* strains producing heat-stable enterotoxin b (STb) isolated from humans with diarrhea. *J Clin Microbiol* **29**, 656-9.
- Luck S. N., Bennett-Wood V., Poon R., Robins-Browne R. M. and Hartland E. L. (2005) Invasion of epithelial cells by locus of enterocyte effacement-negative enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **73**, 3063-71.
- MacKenzie C. R., Hirama T., Lee K. K., Altman E. and Young N. M. (1997) Quantitative analysis of bacterial toxin affinity and specificity for glycolipid receptors by surface plasmon resonance. *J Biol Chem* **272**, 5533-8.
- Menard L. P. and Dubreuil J. D. (2002) Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 (EAST1): a new toxin with an old twist. *Crit Rev Microbiol* **28**, 43-60.
- Moon H. W., Hoffman L. J., Cornick N. A., Booher S. L. and Bosworth B. T. (1999) Prevalences of some virulence genes among *Escherichia coli* isolates from swine presented to a diagnostic laboratory in Iowa. *J Vet Diagn Invest* **11**, 557-60.
- Moseley S. L., Samadpour-Motalebi M. and Falkow S. (1983) Plasmid association and nucleotide sequence relationships of two genes encoding heat-stable enterotoxin production in *Escherichia coli* H-10407. *J Bacteriol* **156**, 441-3.
- Nagy B. and Fekete P. Z. (1999) Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in farm animals. *Vet Res* **30**, 259-84.
- Nagy B. and Fekete P. Z. (2005) Enterotoxigenic *Escherichia coli* in veterinary medicine. *Int J Med Microbiol* **295**, 443-54.
- Nataro J. P., Deng Y., Cookson S., Cravioto A., Savarino S. J., Guers L. D., Levine M. M. and Tacket C. O. (1995) Heterogeneity of enteroaggregative *Escherichia coli* virulence demonstrated in volunteers. *J Infect Dis* **171**, 465-8.
- Nataro J. P. and Kaper J. B. (1998) Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* **11**, 142-201.
- Ngeleka M., Pritchard J., Appleyard G., Middleton D. M. and Fairbrother J. M. (2003) Isolation and association of *Escherichia coli* AIDA-I/STb, rather than EAST1 pathotype, with diarrhea in piglets and antibiotic sensitivity of isolates. *J Vet Diagn Invest* **15**, 242-52.
- Niewerth U., Frey A., Voss T., Le Bouguenec C., Baljer G., Franke S. and Schmidt M. A. (2001) The AIDA autotransporter system is associated with F18 and stx2e in *Escherichia coli* isolates from pigs diagnosed with edema disease and postweaning diarrhea. *Clin Diagn Lab Immunol* **8**, 143-9.
- Nishikawa Y., Zhou Z., Hase A., Ogasawara J., Kitase T., Abe N., Nakamura H., Wada T., Ishii E. and Haruki K. (2002) Diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from stools of sporadic cases of diarrheal illness in Osaka City, Japan between 1997 and 2000: prevalence of enteroaggregative *E. coli* heat-stable enterotoxin 1 gene-possessing *E. coli*. *Jpn J Infect Dis* **55**, 183-90.
- Okamoto K., Baba T., Yamanaka H., Akashi N. and Fujii Y. (1995) Disulfide bond formation and secretion of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II. *J Bacteriol* **177**, 4579-86.
- Okamoto K. F. Y., Akashi N., Hitotsubashi S., Kurazono H., Karasawa T., Tekeda Y. (1993) Identification and characterization of heat-stable enterotoxin II-

- producing *Escherichia coli* from patients with diarrhea. . *Microbiol Immunol* **37**, 411-414.
- Osek J. (2003) Detection of the enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 (EAST1) gene and its relationship with fimbrial and enterotoxin markers in *E. coli* isolates from pigs with diarrhoea. *Vet Microbiol* **91**, 65-72.
- Paiva de Sousa C. and Dubreuil J. D. (2001) Distribution and expression of the astA gene (EAST1 toxin) in *Escherichia coli* and Salmonella. *Int J Med Microbiol* **291**, 15-20.
- Parsot C. (2005) Shigella spp. and enteroinvasive *Escherichia coli* pathogenicity factors. *FEMS Microbiol Lett* **252**, 11-8.
- Peterson J. W. and Ochoa L. G. (1989) Role of prostaglandins and cAMP in the secretory effects of cholera toxin. *Science* **245**, 857-9.
- Peterson J. W. and Whipp S. C. (1995) Comparison of the mechanisms of action of cholera toxin and the heat-stable enterotoxins of *Escherichia coli*. *Infect Immun* **63**, 1452-61.
- Pierard D., Muyldermans G., Moriau L., Stevens D. and Lauwers S. (1998) Identification of new verocytotoxin type 2 variant B-subunit genes in human and animal *Escherichia coli* isolates. *J Clin Microbiol* **36**, 3317-22.
- Pugsley A. P. (1993) The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. *Microbiol Rev* **57**, 50-108.
- Qadri F., Svennerholm A. M., Faruque A. S. and Sack R. B. (2005) Enterotoxigenic *Escherichia coli* in developing countries: epidemiology, microbiology, clinical features, treatment, and prevention. *Clin Microbiol Rev* **18**, 465-83.
- Rousset E., Harel J. and Dubreuil J. D. (1998) Sulfatide from the pig jejunum brush border epithelial cell surface is involved in binding of *Escherichia coli* enterotoxin b. *Infect Immun* **66**, 5650-8.
- Ruth N., Mainil J., Roupie V., Frere J. M., Galleni M. and Huygen K. (2005) DNA vaccination for the priming of neutralizing antibodies against non-immunogenic STa enterotoxin from enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Vaccine* **23**, 3618-27.
- Savarino S. J., Fasano A., Robertson D. C. and Levine M. M. (1991) Enteroaggregative *Escherichia coli* elaborate a heat-stable enterotoxin demonstrable in an in vitro rabbit intestinal model. *J Clin Invest* **87**, 1450-5.
- Schmidt H., Scheef J., Morabito S., Caprioli A., Wieler L. H. and Karch H. (2000) A new Shiga toxin 2 variant (Stx2f) from *Escherichia coli* isolated from pigeons. *Appl Environ Microbiol* **66**, 1205-8.
- Schmitt C. K., McKee M. L. and O'Brien A. D. (1991) Two copies of Shiga-like toxin II-related genes common in enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains are responsible for the antigenic heterogeneity of the O157:H- strain E32511. *Infect Immun* **59**, 1065-73.
- Segrest J. P., De Loof H., Dohlman J. G., Brouillette C. G. and Anantharamaiah G. M. (1990) Amphipathic helix motif: classes and properties. *Proteins* **8**, 103-17.
- Senerwa D., Olsvik O., Mutanda L. N., Lindqvist K. J., Gathuma J. M., Fossum K. and Wachsmuth K. (1989) Enteropathogenic *Escherichia coli* serotype O111:HNT isolated from preterm neonates in Nairobi, Kenya. *J Clin Microbiol* **27**, 1307-11.

- Servin A. L. (2005) Pathogenesis of Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* **18**, 264-92.
- So M. and McCarthy B. J. (1980) Nucleotide sequence of the bacterial transposon Tn1681 encoding a heat-stable (ST) toxin and its identification in enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**, 4011-5.
- Spandau D. F. and Lee C. H. (1987) Determination of the promoter strength of the gene encoding *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II. *J Bacteriol* **169**, 1740-4.
- Spangler B. D. (1992) Structure and function of cholera toxin and the related *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Microbiol Rev* **56**, 622-47.
- Stephan R. and Untermann F. (1999) Virulence factors and phenotypical traits of verotoxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from asymptomatic human carriers. *J Clin Microbiol* **37**, 1570-2.
- Sukumar M., Rizo J., Wall M., Dreyfus L. A., Kupersztoch Y. M. and Gierasch L. M. (1995) The structure of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin b by nuclear magnetic resonance and circular dichroism. *Protein Sci* **4**, 1718-29.
- Taillon C., Nadeau E., Mourez M. and Dubreuil J. D. (2008) Heterogeneity of *Escherichia coli* STb enterotoxin isolated from diseased pigs. *J Med Microbiol* **57**, 887-90.
- Thelestam M., Olofsson A., Blomqvist L. and Hebert H. (1991) Oligomerisation of cell-bound staphylococcal alpha-toxin in relation to membrane permeabilisation. *Biochim Biophys Acta* **1062**, 245-54.
- Tikhonova E. B., Devroy V. K., Lau S. Y. and Zgurskaya H. I. (2007) Reconstitution of the *Escherichia coli* macrolide transporter: the periplasmic membrane fusion protein MacA stimulates the ATPase activity of MacB. *Mol Microbiol* **63**, 895-910.
- van der Goot F. G., Lakey J., Pattus F., Kay C. M., Sorokine O., Van Dorsselaer A. and Buckley J. T. (1992) Spectroscopic study of the activation and oligomerization of the channel-forming toxin aerolysin: identification of the site of proteolytic activation. *Biochemistry* **31**, 8566-70.
- Veilleux S., Holt N., Schultz B. D. and Dubreuil J. D. (2008) *Escherichia coli* EAST1 toxin toxicity of variants 17-2 and O 42. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **31**, 567-78.
- Wang Y., Ren J., Lan L., Yan X., Huang X., Peng Q., Tang H., Zhang B., Ji H. and Huang L. (2007) Characterization of polymorphisms of transferrin receptor and their association with susceptibility to ETEC F4ab/ac in pigs. *J Anim Breed Genet* **124**, 225-9.
- Weikel C. S., Nellans H. N. and Guerrant R. L. (1986) In vivo and in vitro effects of a novel enterotoxin, STb, produced by *Escherichia coli*. *J Infect Dis* **153**, 893-901.
- Weinstein D. L., Jackson M. P., Samuel J. E., Holmes R. K. and O'Brien A. D. (1988) Cloning and sequencing of a Shiga-like toxin type II variant from *Escherichia coli* strain responsible for edema disease of swine. *J Bacteriol* **170**, 4223-30.
- Weintraub A. (2007) Enterotoxigenic *Escherichia coli*: epidemiology, virulence and detection. *J Med Microbiol* **56**, 4-8.

- Whipp S. C. (1991) Intestinal responses to enterotoxigenic *Escherichia coli* heat-stable toxin b in non-porcine species. *Am J Vet Res* **52**, 734-7.
- Whipp S. C., Kokue E., Morgan R. W., Rose R. and Moon H. W. (1987) Functional significance of histologic alterations induced by *Escherichia coli* pig-specific, mouse-negative, heat-stable enterotoxin (STb). *Vet Res Commun* **11**, 41-55.
- Yamanaka H., Kobayashi H., Takahashi E. and Okamoto K. (2008) MacAB is involved in the secretion of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II. *J Bacteriol* **190**, 7693-8.
- Yamanaka H., Tadokoro S., Miyano M., Takahashi E., Kobayashi H. and Okamoto K. (2007) Studies on the region involved in the transport activity of *Escherichia coli* TolC by chimeric protein analysis. *Microb Pathog* **42**, 184-92.
- Zamboni A., Fabbicotti S. H., Fagundes-Neto U. and Scaletsky I. C. (2004) Enteraggregative *Escherichia coli* virulence factors are found to be associated with infantile diarrhea in Brazil. *J Clin Microbiol* **42**, 1058-63.
- Zhang W., Zhao M., Ruesch L., Omot A. and Francis D. (2007) Prevalence of virulence genes in *Escherichia coli* strains recently isolated from young pigs with diarrhea in the US. *Vet Microbiol* **123**, 145-52.